

UNTERSUCHUNG DER ZELLULÄREN
UND IN DAS KULTURMEDIUM ABGEGEBENEN
GLYKOKONJUGATE
VON EMBRYONALEN MÄUSEFIBROBLASTEN
WÄHREND DES ZELLZYKLUS

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Angela Otto
aus Freiburg i.Br.

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNG DER ZELLULÄREN
UND IN DAS KULTURMEDIUM ABGEGEBENEN
GLYKOKONJUGATE
VON EMBRYONALEN MÄUSEFIBROBLASTEN
WÄHREND DES ZELLZYKLUS

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität
zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Angela Otto
aus Freiburg i.Br.

1978

Dekan: Prof. Dr. P. Schopfer

Leiter der Arbeit: Dr. P. F. Mühlradt

Referent: Prof. Dr. P. Sitte

Koreferent: Dr. W. Michalke



Es bedarf vieler Gedanken, um einen festzuhalten.

S. J. Lec

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung "Zellulärer Stofftransport" der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH in Braunschweig-Stöckheim unter der Leitung von Herrn Dr. P.F. Mühlradt durchgeführt.

Herrn Dr. P.F. Mühlradt danke ich für die Überlassung des Themas und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Für kritische Diskussionen bei der Fertigstellung des Manuskripts danke ich Herrn Dr. G. Rosenfelder.

Allen Mitarbeitern möchte ich für die Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit danken.

Der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH danke ich für die Gewährung eines Stipendiums.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG

1

METHODEN

I. Zellkultur	10
1.) Lösungen	10
2.) Primärkultur	12
3.) Transfer und Mediumwechsel	13
4.) Einfrieren und Auftauen von Fibroblasten	15
5.) Zellzählung	16
6.) Ansetzen von Versuchskulturen	16
II. Inkorporation radioaktiver Vorstufen	18
1.) Zellmaterial	18
a.) Ernten der Zellen	18
b.) Trichloressigsäure-Fällung	18
c.) Chloroform-Methanol-Extraktion	19
2.) Kulturüberstand	20
3.) Membranpräparation	20
a.) Gewinnung der Membran	20
b.) Reinigung der Membranpräparation	20
III. Radioaktivitätsbestimmung	23
1.) Scintillationszählung doppelt markierter Proben	23
2.) Funkenkammer	23
3.) Autoradiographie	23
IV. Identifizierung der radioaktiv markierten Zucker	24
1.) Hydrolsyse	24
a.) Zellmaterial	24
b.) Kulturüberstand	24
2.) Auftrennung der Zuckergemische	26
a.) Hochspannungselektrophorese	26
b.) Papierchromatographie	26
c.) Dünnschichtchromatographie	26

V. Charakterisierung der radioaktiv markierten Glykokonjugate	27
1.) Enzymbehandlung	27
a.) Pronase	27
b.) Hyaluronidase	27
c.) Glukuronidase	27
2.) Gelfiltration	28
a.) P100-Säule	28
b.) P2-Säule	28
c.) Eichproben und Nachweis	28
VI. Auftrennung der Glykosaminoglykane	29
1.) Agarose-Gelelektrophorese	29
2.) Fixieren und Anfärbung mit Alcianblau	29
3.) Radioaktivitätsverteilung	30
VII. Isolierung und Auftrennung der Glykolipide	30
1.) Trennung der Neutralglykolipide und Ganglioside	30
a.) Folch-Verteilung	30
b.) DEAE-Sephadex-Chromatographie	32
2.) Auftrennung der Neutralglykolipide	33
a.) Acetylierung und Elution über eine Florisil-Säule	33
b.) Deacetylierung	34
c.) Dünnschichtchromatographie	34
3.) Auftrennung der Ganglioside	35
a.) Entsalzen über LH 20-Säule	35
b.) Verteilung nach Carter und Kanfer	36
c.) Dünnschichtchromatographie	36

ERGEBNISSE

I. Einbau radioaktiver Vorstufen in Fibroblastenkulturen	38
A. <u>Einfluß der Kulturbedingungen</u>	38
1.) Versuch der Stimulierung mit Lipopolysaccharid	38
2.) Einfluß der Zelldichte	40
3.) Einfluß der Serumkonzentration	40

B. <u>Untersuchungen zum Zellzyklus</u>	43
1.) DNS-Synthese und Zellzahl	43
2.) Synthese von Glykokonjugaten in der Zelle	45
a.) Einbau von ^{14}C -Galaktose und ^3H -Leucin in TCA-fällbares Zellmaterial	47
b.) Einbau von ^{14}C -Galaktose in Glykolipide	49
c.) Einbau von ^{14}C -Galaktose und $^{35}\text{SO}_4^{--}$ in Glykosaminoglykane	51
3.) Radioaktive Markierung der Glykokonjugate, die ins Kulturmedium abgegeben werden	52
a.) Einbau von ^{14}C -Galaktose und ^3H -Leucin	52
b.) Einbau von ^{14}C -Galaktose und $^{35}\text{SO}_4^{--}$ in Glykosaminoglykane	54
C. Diskussion	56
II. Biochemische Untersuchungen an den radioaktiv markierten Glykokonjugaten	60
A. <u>Identifizierung des radioaktiven Zuckers</u>	60
1.) Zellmaterial	60
2.) Kulturüberstand	64
a.) Hydrolyse mit 2N HCl	64
b.) Enzymatische Hydrolyse und anschließende saure Hydrolyse	64
3.) Diskussion	72
B. <u>Verteilung der radioaktiven Markierung in verschiedene Glykokonjugatklassen von Zellen, Plasmamembran und Kulturüberstand</u>	74
1.) Zellmaterial	74
2.) Plasmamembran	80
3.) Kulturüberstand	83
4.) Diskussion	87
C. <u>Untersuchung der Glykosaminoglykane mittels Agarose-Gelelektrophorese</u>	88
1.) Zellmaterial	88
2.) Kulturüberstand	94
3.) Zusammenfassung der Erbenisse über die radioaktive Markierung von Glykosaminoglykanen	97
4.) Diskussion	97

D. <u>Untersuchung der Glykolipide mittels Dünnschichtchromatographie</u>	101
1.) Neutralglykolipide	101
2.) Ganglioside	103
3.) Diskussion	105
 <u>ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION</u>	 107
 <u>LITERATUR</u>	 110
 <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	 118

ABKÜRZUNGEN

BSS	balanced salt solution
PBS	phosphate buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
FMA	Fluoresceinmercuriacetate
DCE	Dichloräthan
CS	Chondroitinsulfat
HA	Hyaluronsäure
Fuc	Fukose
Gal	Galaktose
GalN	Galaktosamin
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
Glc	Glukose
GlcN	Glukosamin
GlcUA	Glukuronsäure
Man	Mannose
NANA	N-Acetylneuraminsäure
Rib	Ribose
Ser	Serine
Xyl	Xylose

EINLEITUNG

Jede wachsende Zelle durchläuft einen Zyklus von Synthesen und Prozessen in festgelegter zeitlicher Folge, die u.a. zur Verdoppelung des Kernmaterials und schließlich zur Zellteilung führen. Nach klassischer Anschauung wird der Zellzyklus anhand der beiden Prozesse, der DNS-Replikation und der Mitose (Kern- und Zellteilung), in vier Phasen unterteilt. Die Zeit der DNS-Synthese wird als S-Phase, die der Mitose als M-Phase definiert, während G_1 und G_2 die Phasen dazwischen bezeichnen (siehe Abb.1). Die Zeitdauer der S- und M-Phasen ist normalerweise für einen Zelltyp konstant.

In der G_1 -Phase wird der Restriktionspunkt R (restriction point) postuliert (1). Dieser Kontrollpunkt wird durch das Zusammenwirken des inneren Programms der Zelle und der äußeren Wachstumsfaktoren reguliert. Er bestimmt, ob und mit welcher Wahrscheinlichkeit die Zelle einen neuen Zellzyklus beginnen kann (transition probability) (2,3). Stellt die Zelle wegen ungünstiger Wachstumsbedingungen oder im Endstadium der Differenzierung das Wachstum ein, so verharret sie in der G_1 -Phase (dann auch G_0 genannt). Bei vielen transformierten Zellen ist diese Kontrolle defekt, d.h. solche Zellen teilen sich unaufhörlich bis sie sterben. Außerdem können Zellen unter bestimmten Bedingungen in der G_2 -Phase aufgehalten werden, wo ein weiterer Kontrollpunkt vermutet wird (4-7). In Abbildung 1 sollen einige Aspekte des Zellzyklus dargestellt werden.

Erst seitdem es möglich ist, tierische Zellen längere Zeit in Kultur wachsen zu lassen, können die Parameter untersucht werden, die einen regulierenden Einfluß auf das Zellwachstum ausüben. Die Untersuchungen befaßten sich im wesentlichen mit zwei Fragestellungen:

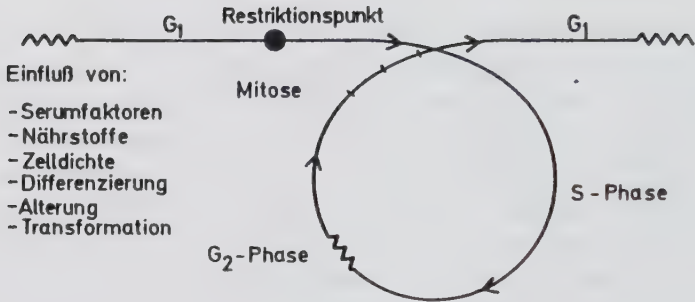


Abb. 1 Darstellung des Zellzyklus

1.) Wechselwirkungen zwischen den Zellen

Bisher ungeklärte interzelluläre Beziehungen können das Wachstum regulieren (density-dependent-inhibition of growth). Darunter darf nicht allein der Zellkontakt verstanden werden (8-12).

2.) Wechselwirkungen der Zelle mit dem Medium

Neben den essentiellen Nährstoffen reguliert die Konzentration an Wachstumsfaktoren (die im beigefügten Serum enthalten sind) das Zellwachstum (13-19).

Nach längerer Kultivationszeit können zu hohe Zelldichte und ein Mangel an Mediumbestandteilen das Wachstum hemmen. Die Zellen verharren dann in der G₁-Phase. Werden die hemmenden Bedingungen aufgehoben, können die Zellen zu neuem Wachstum stimuliert werden.

Ein weiterer wachstumsregulierender Parameter normaler Zellen ist der Alterungsprozess. Die Zellen wachsen nach jeder Teilung immer langsamer bis sie schließlich sterben (20-23).

Es hat sich als wesentlich bequemer erwiesen, nicht mit Zellen zu arbeiten, die direkt tierischen Geweben entnommen wurden, sondern mit daraus entstandenen Zell-Linien. Diese haben den Vorteil, viele Generationen, z.T. jahrelang, ein konstantes Wachstum aufzuweisen, d.h. scheinbar nicht zu altern. Solange die Zell-Linien der erwähnten Wachstumskontrolle unterliegen, werden sie als "normal" bezeichnet, doch zeigen sie gegenüber der Ursprungszelle gravierende Abweichungen. Charakteristisch sind Veränderungen im Karyotyp, sowohl in der Anzahl der Chromosomen wie Abnormalien an den Chromosomen (24,25). Damit sind auch Morphologie und Wachstumseigenschaften verändert (24).

Wenn eine ruhende Zelle zu neuem Wachstum angeregt wird, d.h. einen neuen Zellzyklus beginnt, wird gleichzeitig eine Kette von verschiedenen Reaktionen ausgelöst (pleiotypic response) (26,27). Zu diesen Reaktionen zählen Änderungen in den Konzentrationen cyclischer Nukleotide und erhöhte RNS-, DNS- und Proteinsynthese, wie auch Veränderungen in der Permeabilität der Plasmamembran und beim Transport von Nährstoffen und Ionen (15,28-30).

Im Verlaufe des Zellzyklus werden weitere Veränderungen in der Membran beobachtet. Bis zur Zellteilung muß die Membran sich verdoppeln, damit zwei gleichgroße Tochterzellen entstehen können. Neue Plasmamembrankomponenten, wie Phospholipide und Proteine, werden nicht kurz vor der Mitose, sondern während des gesamten Zellzyklus synthetisiert (31). Das Verhältnis Oberfläche/Volumen bleibt dabei etwa konstant, weil sich die Plasmamembran bis zur Zellteilung in zahlreiche

Mikrovilli ausstülpt (32). Während der Mitose dehnt sich die Membran aus, wobei die Zelle anfälliger wird für Lyse durch Detergentien wie auch für Komplementlyse (33,34).

Die Synthese bestimmter Membrankomponenten wie z.B. von Glykokonjugaten findet dagegen bevorzugt zu bestimmten Zeiten des Zellzyklus statt. Bekannt ist, das Immunglobuline während der G₁-S-Phase maximal synthetisiert und sekretiert werden (35). Bei Mastocytoma-Zellen wurde festgestellt, daß Synthese und Expression von Histokompatibilitätsantigenen der Maus (H-2 Antigene) stark zunimmt (31, 36). Ebenfalls wird das Forssman-Antigen (ein Glykolipid) in der G₁-S-Phase synthetisiert und exponiert (37). Lektinrezeptoren werden vor allem in der Interphase bzw. während der Mitose auf der Zelloberfläche erkannt (31,38). So ist bei 3T3-Fibroblasten die Bindung von ³H-Concanavalin A zu dieser Zeit um etwa das Dreifache erhöht (39). Von den Glykosaminoglykanen ist lediglich bekannt, daß Heparansulfat kurz vor der Mitose von der Zelloberfläche abgegeben wird (40).

Diese Glykokonjugate (Glykoproteine, Glykolipide, Glykosaminoglykane) werden inzwischen als charakteristische Bestandteile der Plasmamembran betrachtet. Obwohl diese nur 0,5 - 2% der gesamten zellulären Membranen darstellt, enthält sie doch 1/2 - 3/4 der komplexen Kohlenhydraten der Zelle (41).

In Abbildung 2 soll eine Vorstellung von der Anordnung der Glykokonjugate in der Plasmamembran gegeben werden. Zugrunde liegt das "fluid mosaic" Membranmodell (42,43). Der Aufbau der Lipid-Doppelschicht ist asymmetrisch, d.h. die äußere und innere Schicht enthalten verschiedene Klassen von Lipiden. Glykolipide wurden bisher nur auf der äußeren Membranseite nachgewiesen (44). Diese Asymmetrie hat ihre Ursache in der geringen "flip-flop" Rate (45).

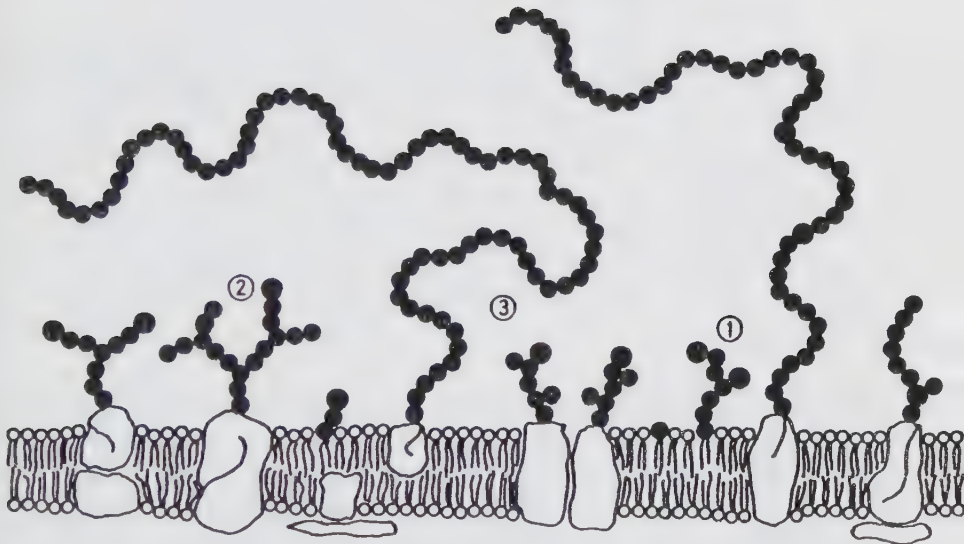


Abb. 2 Darstellung der Plasmamembran mit 1. Glykolipiden, 2. Glykoproteinen und 3. Glykosaminoglykanen

Ebenso sind Glykoproteine asymmetrisch in der Membran verankert, wobei sie die Membran vollständig durchdringen können (46-49). Ihr Kohlenhydratanteil befindet sich dabei immer im extrazellulären Raum. Diese Beobachtung läßt sich mit Befunden über die Biosynthese von Glykoproteinen erklären: sie erfolgt an rauhen endoplasmatischen Retikulum. Schon während der Synthese durchragt das Protein die Membran und wird

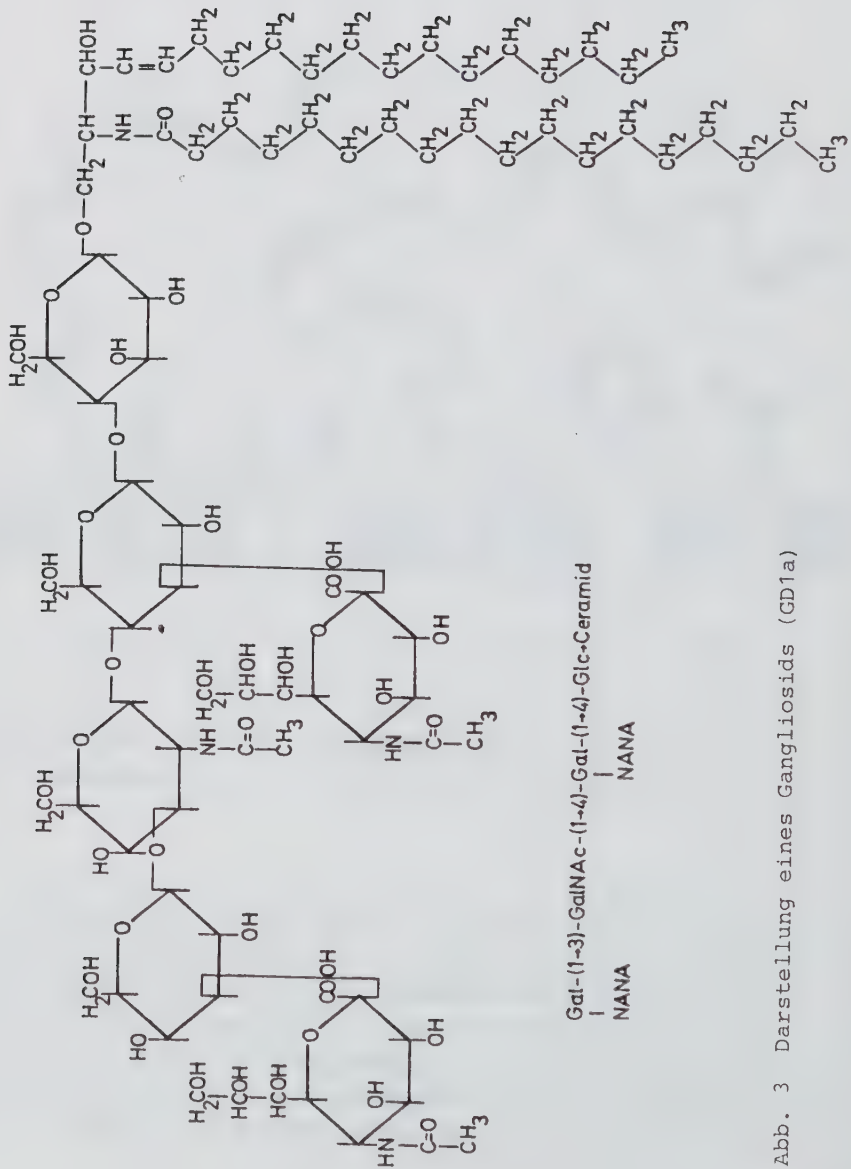


Abb. 3 Darstellung eines Gangliosids (GD1a)

auf der Lumenseite glykosyliert. Diese Seite ist nach der Fusion mit der Plasmamembran dem extrazellulären Raum zugewandt (50-52). Über die Organisation von Glykosaminoglykanen auf der Zelloberfläche ist bisher nichts bekannt.

Die chemische Struktur von Glykolipiden ist in Abbildung 3 dargestellt. Der Lipidteil, das Ceramid, ist aus einer Sphingosinbase und einer Fettsäure aufgebaut. Damit glykosidisch verknüpft sind ein oder mehrere Zucker. Neutralglykolipide enthalten Neutralzucker wie Glukose, Galaktose und Fukose und N-acetylierte Aminos Zucker wie N-Acetylglukosamin und N-Acetylgalaktosamin. Ganglioside enthalten zusätzlich N- und/oder O-substituierte Neuraminsäuren. Die Oligosaccharide können verzweigt sein.

Glykosaminoglykane (oder synonym: Proteoglykane) sind eine Klasse von Makromolekülen, die meist aus einem Peptidteil und einer unverzweigten Polysaccharidkette bestehen. Ihre Grundeinheiten sind Disaccharide, bestehend aus einer Uronsäure (Glukuronsäure oder Iduronsäure) und einem N-acetylierten Aminos Zucker (N-Acetylglukosamin oder N-Acetylgalaktosamin), der meist N- oder O-sulfatiert ist. Je nach der Art der Disaccharideinheiten und ihrer Verknüpfung (immer β -Konformation) gibt es mehrere Klassen an sulfatierten Glykosaminoglykanen: Chondroitin-6-sulfat, Chondroitin-4-sulfat, Dermatan-sulfat, Heparan-sulfat. Allein die Hyaluronsäure ist nicht sulfatiert. Ein Beispiel des Grundgerüsts ist in Abbildung 4 gegeben. Innerhalb der Klasse kann eine Heterogenität durch Verknüpfung verschiedener Disaccharide auftreten (53). Glykosaminoglykane können 2-3-strängige Helices mit Wasserstoffbrücken zwischen den Zuckern derselben Kette wie der anderen Kette bilden (54). Hochmolekulare Hyaluronsäure kann auch dreidimensionale Netze bilden, die als Sieb für Makromoleküle wirken (55).

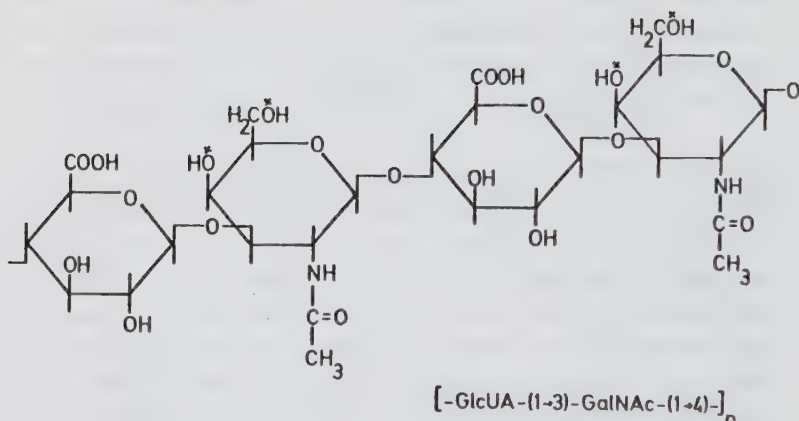


Abb. 4 Darstellung des Grundgerüsts eines Glykosaminoglykans (Chondroitin). * bezeichnet die Bindungsstellen für Sulfat.

Die Verknüpfung von Glykosaminoglykanen mit einer Peptidkette erfolgt meist O-glykosidisch über folgende Oligosaccharidbrücke:



Zwischen der Struktur bestimmter Glykokonjugate der Zelloberfläche und ihrer Funktion ist meistens keine Korrelation herzustellen. Vieles deutet daraufhin, daß sie an wichtigen Prozessen wie Adhäsion zum Substrat, Zell-Zell-Kontakt, und Zell-Zell-Erkennung beteiligt sind und eine Rolle in der Wachstumskontrolle spielen (56-58). Transformierte Zellen zeigen neben Veränderungen in ihren Glykokonjugaten auffallende Abweichungen in ihrer Morphologie und ihrem "sozialen" Verhalten in Kultur. Viele Untersuchungen vergleichen daher die Muster bestimmter Glykokonjugate von "normalen" Zell-

Linien in der Wachstums- und Ruhephase mit dem Virus-transformierter Zellen (59-61). Ein Beispiel dafür ist das LETS- (large external transformation sensitive) Protein, ein Glykoprotein, dem Wachstums-regulierende Funktionen zugeschrieben wird. Es tritt vermehrt bei konfluenten, ruhenden Fibroblasten auf, fehlt jedoch bei den transformierten Zellen (62).

Andere Untersuchungen zu dem Problem der Wachstumsregulation in Zellkultur verfolgen die Synthese (und den Abbau) von Glykokonjugaten während des Zellzyklus. Dazu werden in Versuchen an Zell-Linien radioaktive Vorstufen, meist Zucker angeboten. Es scheint für die Synthese von Glykoproteinen allgemein zu gelten, daß sie vorwiegend während der S-Phase stattfindet (63,64). Jedoch gibt es für die Synthese von Glykolipiden und Glykosaminoglykanen kaum übereinstimmende Ergebnisse.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Synthese von Glykokonjugaten in Fibroblasten und ihre Sekretion ins Kulturmedium während des Zellzyklus verfolgt werden. Um eine Annäherung an "in vivo" Verhältnisse zu erreichen, wurden die Versuche mit embryonalen Mäusefibroblasten anstatt mit Zell-Linien durchgeführt. ^{14}C -Galaktose wird sowohl in Glykoproteine und Glykolipide als auch in Glykosaminoglykane eingebaut und eignet sich daher besonders für deren radioaktive Markierung. Darüber hinaus können sulfatierte Glykosaminoglykane mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markiert werden. Es sollte nicht nur der Einbau radioaktiver Vorstufen in die verschiedenen Glykokonjugatklassen während des Zellzyklus verfolgt werden, sondern es sollten auch qualitative und quantitative Veränderungen der Muster von Glykolipiden und Glykosaminoglykanen untersucht werden.

METHODEN

I. Zellkultur embryonaler Mäusefibroblasten

1.) Lösungen

a.) Trypsin-EDTA-Lösung (Glasgow-Modifikation)

I. 0,25% Trypsin-Lösung:

NaCl	8,0 g
KCl	0,4 g
Na ₂ HPO ₄	0,1 g
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	3,0 g
Glukose	1,0 g
H ₂ O	ad 1000 ml, pH 7,7

5 ml Trypsin (2,5%, Flow) in 45 ml Lösung verdünnt

II. EDTA-Lösung:

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
EDTA (Titriplex III, Merck)	0,2 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Zum Gebrauch: 1 Teil 0,25% Trypsin-Lösung
2 Teile EDTA-Lösung

b.) Kulturmedium

MEM Dulbeccos Modification (Flow) wurde vor Gebrauch
ergänzt mit: 2mM Glutamin
2,5 - 20% Kälberserum von Neugeborenen
(Flow)

keine Zugabe von Antibiotika

c.) Balanced Salt Solution (BSS)

Lösung A:

Glukose	10,0 g
KH_2PO_4	0,6 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	4,8 g
Phenolrot	100 mg
H_2O	ad 1000 ml

Lösung B:

CaCl_2	1,14g
KCl	4,0 g
NaCl	80,0 g
$\text{MgCl} \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	2,0 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	2,0 g
H_2O	ad 1000 ml

Zum Gebrauch: 1 Teil Lösung A,

1 Teil Lösung B auf 10 Teile auffüllen

d.) Phosphat Buffered Saline (PBS)

NaCl	8,0 g
KCl	0,1 g
Na_2HPO_4	1,15g
KH_2PO_4	0,2 g
MgCl_2	0,1 g
CaCl_2	0,1 g
H_2O	ad 1000 ml

2.) Primärkultur

BALB/c-Inzuchtmäuse (Zentralinstitut für Versuchstierhaltung, Hannover) wurden unter konventionellen Bedingungen gehalten (Futter und Wasser ad libitum, natürlicher Tag/Nacht-Rythmus). Trächtige Weibchen wurden etwa 14 Tage nach Gestation mit Stickstoff getötet und die Embryonen sofort entfernt.

Die Säuberung und Zerkleinerung der Embryos geschah unter sterilen Bedingungen in BSS (siehe: Lösungen) bei Raumtemperatur. Den einzelnen Embryonen wurden Kopf, Gedärme, Lunge, Herz und Extremitäten entfernt und die verbleibende Hülle in einer sterilen Petrischale ohne BSS mit einer Schere zerkleinert.

Um einzelne Zellen aus dem zerkleinerten Gewebe zu gewinnen, wurden die Gewebefragmente dreimal in etwa 50 ml 0,25% Trypsin-Lösung (siehe: Lösungen) bei Raumtemperatur 20 min gerührt und absitzen lassen. (Durch Zugabe von etwa 1 mg DNase (Boehringer) zu der ersten Trypsin-Lösung konnte die Bildung von DNS-Schleim verhindert werden.) Der trübe Überstand wurde jeweils sofort über einem Serumkissen bei 200 xg 10 min zentrifugiert und das Zellsediment in Medium (siehe: Lösungen) aufgenommen. Die drei Zellsuspensionen wurden zusammen gegeben. Die Anzahl lebender Zellen war wesentlich höher, wenn die Zellsuspension nicht in Eis, sondern bei Raumtemperatur stand.

Die Aussaat der Zellen erfolgte in 10 ml Medium mit 20% Kälberserum in 90 mm Petrischalen (Greiner) bzw. in 20 ml in 75 cm² Kulturflaschen (Falcon). Der Zelltitel betrug etwa 1×10^6 Zellen/ml.

Die Kulturen wurden bei 37°C in einem 10% CO₂-Luftgemisch inkubiert (CO₂-begaster Brutschrank von Heraeus). Für hohe Luftfeuchtigkeit sorgten zwei Wannen mit destilliertem Wasser. Am Tage nach der Aussaat wurde das Kulturmedium gewechselt, um freischwimmende Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

3.) Zelltransfer und Mediumwechsel

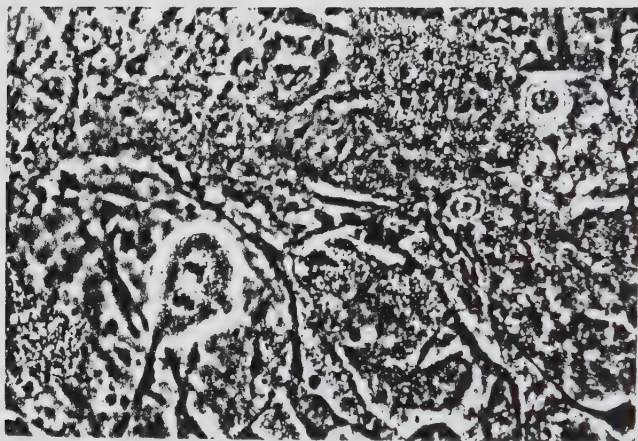
Nach der Aussaat nahmen die Fibroblasten die typische abgeflachte, stern- bis spindelförmige Form an und wuchsen in 5-7 Tagen zu einem geschlossenen Zellrasen heran (Konfluenz). Solche wachsende und konfluente Kulturen sind in Abbildung 5 dargestellt. Bei Erreichen von Konfluenz wurden die Fibroblasten transferiert.

Das alte Kulturmedium wurde abgesaugt, der Zellrasen mit Trypsin-EDTA-Lösung (siehe: Lösungen) bedeckt und bei 37°C inkubiert. Meist reichten 7 min aus, damit der Zellrasen sich vom Gefäßboden ablöste und die einzelnen, abgerundeten Zellen in Suspension gingen. Die Suspension wurde durch ein Serumkissen zentrifugiert und das Zellsediment in Medium aufgenommen.

Die Wahl des Kulturgefäßes für die Aussaat der Zellen richtete sich nach der Gesamtzahl des Ansatzes. Dabei wurden folgende Bedingungen eingehalten:

- Der Zelltiter wurde im Medium mit 10% Serum auf 0,2 bis 0,3 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt.
- Bei der Aussaat sollte eine Zelldichte von 6-8 x 10⁴/cm² eingehalten werden. Die Schichtdicke des Kulturmediums über dem Zellrasen schwankte dabei zwischen 2,5 bis 4 mm.

a.)



b.)

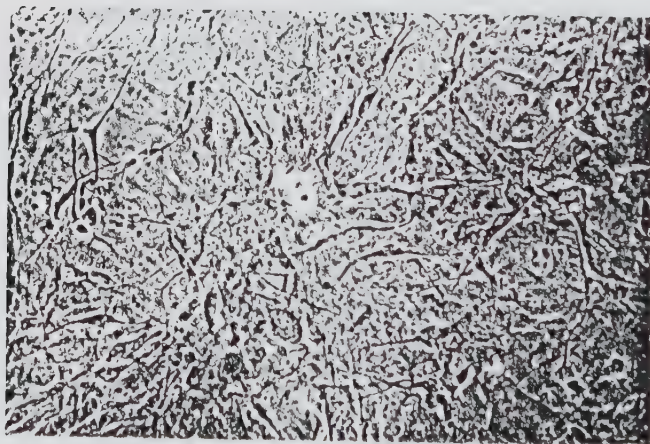


Abb. 5 Embryonale Mäusefibroblasten nach dem 4. Transfer.
Phasenkontrast. Vergrößerung a.) 320 x b.) 128 x

Statt die Zellen zu transferieren, konnten konfluente Fibroblasten weitere 1-2 Wochen durch ein- oder zweimaligen Mediumwechsel in Kultur gehalten werden. Das alte Kulturmedium wurde abgesaugt und durch Medium mit 5% Serum ersetzt.

4.) Einfrieren und Auftauen von Fibroblastenkulturen

Um Fibroblasten längere Zeit auf Vorrat halten zu können, wurden sie eingefroren. Mit folgender Vorschrift wurden gute Überlebensraten erreicht.

Die Zellkonzentration der Suspension aus trypsinisierten Zellen wurde aus 20×10^6 /ml Medium mit 25-30% Serum und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) eingestellt. In ein 10 cm langes, steriles Glas (Sovirel) mit 0,5 cm Durchmesser wurde jeweils 1 ml Suspension eingefüllt und das Glas zugeschmolzen.

Am günstigsten erwies sich das Einfrieren in zwei Stufen (65):

- 1.) Die Ampullen wurden 10 min lang in ein -26°C -Kältebad aus 60% Glykol und 40% Wasser eingetaucht.
- 2.) Darauf wurden die Ampullen direkt in ein Gefäß mit flüssigem Stickstoff (-196°C) übertragen.

Die Ampullen lagerten bis zu einem Jahr in einem Dewargefäß unter flüssigem Stickstoff (Liquified Gas Container, Union Carbide).

Zum erneuten Kultivieren der eingefrorenen Zellen wurden die Ampullen im 37°C -Wasserbad in 40 sec aufgetaut, die Ampullenspitze abgesägt und die Zellsuspension in frisches Medium mit 20% Serum übertragen. Für die Überlebensrate der Zellen war es wichtig, das DMSO schnell und mindestens 10-fach zu verdünnen. Nach der Zellzählung erfolgt die Aussaat wie für Primärkulturen. Am folgenden Tage wurde das Medium gewechselt.

Im Durchschnitt wurden nach dem Auftauen 82% lebende Zellen gezählt, die sich innerhalb weniger Tage verdoppelten. Bei geringeren Überlebensraten (unter 75%) jedoch nahm die Zellzahl zunächst ab. Gut angewachsene Kulturen zeigten keine Veränderungen in ihrem Wachstum und den Einbauraten verschiedener Radioisotopen gegenüber Fibroblasten, die nicht eingefroren worden waren.

5.) Zellzählung

Um die Anzahl lebender Zellen zu bestimmen, wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit 0,16% Trypanblau-0,15% NaCl-Lösung gemischt. Nach einer Minute wurden die lebenden (Trypanblau-negativen) Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

6.) Ansetzen von Versuchskulturen

Um reproduzierbare Einbauergebnisse zu erhalten, wurde folgendes Versuchsprotokoll eingehalten: Als letzter Transfer wurden 6-7 Tage vor dem geplanten Versuch $0,1 \times 10^6$ Zellen/ml Medium mit 10% Serum ausgesät. Mediumwechsel konnte ein Tag nach der letzten Aussaat durchgeführt werden ohne Einfluß auf den späteren Einbau.

Für die Einbaukinetik von Radioisotopen in Fibroblasten wurden $0,6 \times 10^6$ trypsinierte Zellen in 2 ml Medium mit 5% Serum in 35 mm Petrischalen ausgesät. Für biochemische Untersuchungen wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen in 5 ml Kulturmedium in 60 mm Petrischalen kultiviert. Zur Gewinnung von Membranen wurden 6×10^6 Zellen in 20 ml Kulturmedium im 75 cm^2 Falconflaschen gegeben. In allen Kulturansätzen betrug die ausgesäte Zelldicht $8 \times 10^4/\text{cm}^2$.

Radioisotope (New England Nuclear) wurden in 12 Stunden-pulsen zugegeben wie folgt:

radioaktive Vorstufe	spezifische Aktivität (Ci/nmole)	zugegebene Radioaktivität (µCi/ml Kultur)	Konzentration der Vorstufe in Kultur (M)
[methyl- ³ H] Thymidin	2	0.1	5×10^{-8}
L-[4,5- ³ H(N)] Leucin	5	0.5	8×10^{-4} (1)
D-[1- ¹⁴ C] Galaktose	0.054	0.5	2×10^{-5} (2)
Na ³⁵ SO ₄	0.01 - 1 (t _{1/2} =87d)	5	8×10^{-3} (1)

(1) im Kulturmedium vorhanden

(2) ergänzt mit "kalter" Galaktose

Um den Einbau in Trichloressigsäure-fällbares Zellmaterial zu verfolgen, wurden diese Ansätze meistens mit ¹⁴C-Galaktose und ³H-Leucin doppelt markiert. Änderungen im Versuchsprotokoll werden bei den einzelnen Ergebnissen beschrieben.

II. Inkorporation radioaktiver Vorstufen

1.) Zellmaterial

a.) Ernten von Zellen Bei ^{14}C -Galaktose- und ^3H -Leucin-markierten Kulturen wurde der Einbau dieser Radioisotopen in hochmolekulares Zellmaterial untersucht. Die Kulturüberstände wurden abgehoben und der Zellrasen zweimal mit kaltem PBS (siehe: Lösungen) gespült. Um einen Verlust an Oberflächenmaterial durch Trypsin zu vermeiden, wurde der Zellrasen in 1 ml kaltem PBS mit einem Gummischaber von dem Petrischalenboden abgeschabt.

Zur Untersuchung der Glykokonjugate wurden die Zellen zunächst zentrifugiert und das Sediment bei -20°C eingefroren. Aufgetautes Zellmaterial wurde in 3-4 ml H_2O entweder mit einem Ultraschallgerät (Branson Sonifier) oder im 5 ml-Gefäß des Omni-Mixer (Sorvall) aufgebrochen. Anschließend wurde gegen H_2O bei 4°C dialysiert.

^3H -Thymidin markierte Kulturen wurden mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung 10 min bei 37°C inkubiert. Von dieser Zellsuspension wurden 25 μl zur Zellzählung entnommen.

b.) Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) Die ^{14}C -Galaktose/ ^3H -Leucin- und die ^3H -Thymidin-markierten Zellsuspensionen wurden mit 25 μl Serum als Träger versehen und mit 1 ml 15% TCA-Lösung gefällt. Die Petrischalen wurden mit 7,5% TCA-Lösung nachgespült und die Spülflüssigkeit zu der jeweiligen Fällung dazugegeben. Die Fällungen standen bei 4°C bis zum Ende des Versuches. Dann wurden die Fällungen bei 1000 xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment konnte mit 50 μl 1 N NaOH aufgelöst und mit 2 ml 7,5% TCA-Lösung erneut gefällt werden. Zur vollständigen Fällung standen die Ansätze mindestens 30 min bei 4°C , worauf sie

nochmals zentrifugiert wurden. Die Sedimente wurden in 200 μ l 1% NH_3 -Lösung aufgelöst und zur Radioaktivitätszählung in 10 ml Scintillationsflüssigkeit aufgenommen.

c.) Chloroform-Methanol Extraktion Bei der TCA-Fällung werden Lipide zum größten Teil mitgefällt. Die Lipide können jedoch selektiv mit Chloroform-Methanol aus dem Zellmaterial extrahiert werden. Die aufgetaute, meist schleimige Zellsuspension wurde über ein Glasfilter (Whatman GF/A) gegeben und zweimal mit PBS oder H_2O nachgespült, um niedermolekulares Zellmaterial herauszuwaschen. Das Zellmaterial auf dem Filter wurde in 4 ml Chloroform-Methanol 2:1 in 5 ml-Gefäß des Omni-Mixers 2 min lang homogenisiert. Dieses Homogenisat wurde über ein Glasfaserfilter abfiltriert, das Filtrat aufgefangen. Der Rückstand auf dem Filter wurde nochmals in 4 ml Chloroform-Methanol 1:1 homogenisiert und dieses Filtrat mit dem ersten vereint. Das Filter wurde mit Chloroform-Methanol 2:1 und 1:1 gespült und der gesamte Extrakt unter Stickstoffstrom im 40°C Wasserbad eingengt. Das Probengefäß wurde mit 2 ml Chloroform-Methanol 2:1 gespült, unlösliches Material gegebenenfalls abzentrifugiert und der Überstand auf 5 ml ergänzt. Zur Radioaktivitätszählung wurden 200 μ l abgenommen und getrocknet.

Um radioaktiv markierte Neutralglykolipide und Ganglioside zu trennen, wurde eine Folch-Verteilung (66) durchgeführt. Dazu wurden die 5 ml Extrakt mit 1 ml 0,1 M KCl kräftig geschüttelt und zur schnelleren Phasentrennung zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgehoben und das Volumen ersetzt durch die theoretische Oberphase. Nach dem Schütteln und der Phasentrennung wurde dieser Schritt einmal wiederholt. Die gesammelten Oberphasen und die Unterphasen wurden jeweils in Scintillationsgläschen eingengt und in 10 ml Scintillationsflüssigkeit aufgenommen.

2.) Kulturüberstand

Gesammelte Kulturüberstände von ^{14}C -Galaktose- und ^3H -Leucin-markierten Zellen wurden zunächst bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden sie klarzentrifugiert, bei 4°C gegen H_2O dialysiert (um nicht eingebaute radioaktive Vorstufen zu entfernen, lyophilisiert und in H_2O aufgenommen).

3.) Membranpräparation

a.) Gewinnung der Membran Fibroblastenmembranen wurden nach einer Methode von Barland und Schroeder (67,68) bereitet. Der in 75 cm^2 Flaschen kultivierte und mit ^{14}C -Galaktose und ^3H -Leucin-markierte Zellrasen wurde dreimal mit 10 ml PBS gespült und dann mit 20 ml 1 mM wässrigem ZnCl_2 und Dimethylsulfoxid, 4:1 (v/v), 10 min bedeckt. Der Überstand wurde verworfen. Der noch intakte Zellrasen wurde mit 20 ml gesättigter FMA-Lösung (0,8 g Fluoresceinquecksilberacetat (Serva) in 1000 ml 0,02 M Tris-HCl, pH 8,1) 15 min lang auf Eis sanft geschüttelt. Dabei sollen die Membranen von der oberen Seite des Fibroblastenrasen in großen Stücken "abgezogen" werden, jedoch ohne den Zellverband aufzulösen. Der Überstand mit den Membranen wurde im HB-4 Rotor (Sorval) bei 1000 xg 15 min lang zentrifugiert, um ein möglichst wasserfreies Sediment zu erhalten, ohne dabei die Membranen zu stark zu verkleben (zuviel Wasser beeinträchtigt die anschließende Phasentrennung).

b.) Reinigung der Membranpräparation Zur Reinigung der Membranen wurde folgendes polymeres Zweiphasensystem hergestellt (69):

- 200 g 20% Dextran T500 (Pharmacia) in H_2O
- 103 g 30% Polyäthylenglykol 6000 (Serva) in H_2O
- 333 ml 0,22 M Na-Phosphat-Puffer pH 6,5
- 179 ml H_2O

Die Lösungen wurden in einem Schütteltrichter gemischt und über Nacht bei $4^{\circ}C$ stehengelassen. Ober- und Unterphase wurden getrennt abgefüllt.

Die Membransedimente wurden in 10 ml Oberphase aufgenommen und nach Zugabe von 10 ml Unterphase geschüttelt und zentrifugiert 10 min bei 8000 xg. Die Membranen sammeln sich dabei an der Interphase, während dichteres Material (auch verklumpte Membranpartikel) ein Sediment bilden. Der aus zwei Phasen bestehende Überstand wurde umgegossen, die Phasen nochmals vermischt und zentrifugiert. Die Membranen der Interphase wurden mit einer Pasteurpipette gesammelt und mit Wasser die Polymere herausverdünnt. Membranen wurden in H_2O bei $4^{\circ}C$ aufbewahrt.

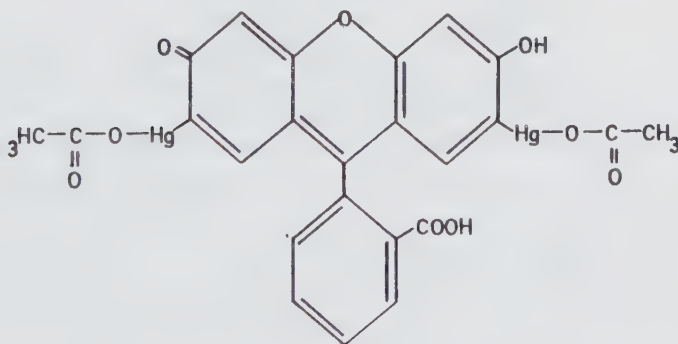


Abb. 6: Darstellung des Fluoresceinquecksilberacetat (FMA)
Das Molekül ermöglicht kovalente Bindung zwischen Hg- und S-Atom einer Thiol- oder Disulfidgruppe. Der Wirkungsmechanismus bei der Membranisolierung ist nicht bekannt (70).

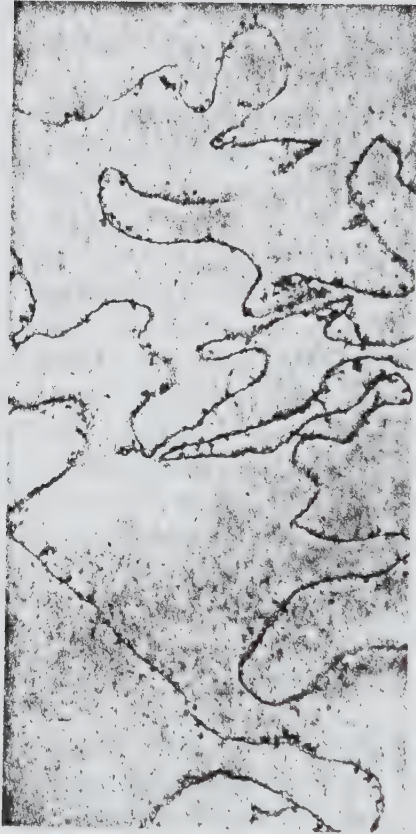


Abb. 7 Fibroblastenmembranen im Elektronenmikroskop.

Fixierung: 1%OsO₄

Vergrößerung: 51200 x

Ausführung: Frau I. Geffers

III. Radioaktivitätsbestimmung

1.) Scintillationszählung doppelmarkierter Proben

Mit $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -doppelmarkierte Proben wurden im Packard-Scintillationszähler auf zwei Kanälen gezählt. Die Überlappung der Strahlungsenergien wurde anhand einzelner Radioisotopen bestimmt und in folgender Formel berücksichtigt:

$$\begin{aligned}\text{cpm}(^{14}\text{C}) &= \text{cpm}(\text{R}) - 20 - 0,36(\text{cpm}(\text{G}) - 18) \\ \text{cpm}(^3\text{H}) &= 1,33(\text{cpm}(\text{G}) - 20)\end{aligned}$$

Als Scintillationsflüssigkeit wurde verwendet: Aquasol (New England Nuclear). Die Umrechnung der gemessenen Daten erfolgte durch ein entsprechendes Computerprogramm.

2.) Funkenkammer

Die radioaktiven Flecken eines Chromatogramms (auf Papier oder Dünnschichtplatte) wurden in einer Funkenkammer (Birch-over Instruments LTD) nachgewiesen. Der Nachweis beruht darauf, daß durch Gasionisation entstehende Funken von einer Polariod-Kamera fotografiert werden.

3.) Autoradiographie

Auf trockenen, nicht angefärbten Dünnschichtplatten und Agarose-Gelplatten wurde ein Röntgenfilm (Kodak RP X-Omat) 3 Tage bis 3 Wochen lang belichtet.

IV. Identifizierung der radioaktiv markierten Zucker

1.) Hydrolyse

a.) Zellmaterial Als schonende Methode um auch Aminosucker enthaltende Polysaccharide zu spalten, bietet sich die Hydrolyse mit einem Ionenaustauscher an (71). Etwa 1 ml feuchtes DOWEX 50Wx4 (200-400 mesh), Serva) wurde mit 4-5 ml 0,1 N HCl equilibriert, danach dreimal mit H₂O gewaschen und kurz getrocknet. Davon wurden ca. 50 mg mit 500 µl 0,01 N HCl und 4 µl 0,1% Zuckerstandardlösung (Inosit, Glukosamin, Galaktosamin, Glukose, Galaktose, Mannose, Fukose, Ribose) zum lyophilisierten Zellmaterial (25000 cpm) gegeben und im Glas mit Stickstoff überschichtet eingeschmolzen. Das Reaktionsgemisch wurde 25 Stunden bei 100°C inkubiert.

Das Hydrolysat wurde auf ein mit Glaswolle gestoffte Pasteurpipette gegeben und mit 500 µl 9% Triäthylamin langsam die Aminosucker und dann mit 500 µl H₂O die übrigen Zucker von den DOWEX eluiert. Das Eluat wurde mit 2 ml Petroleumbenzin (Siedebereich 40-60°C) vorsichtig ausgeschüttelt und die untere Phase eingeeengt. Dabei wurden Fettsäuren aus dem Hydrolysat entfernt. Anschließend wurde die Probe in der Hochspannungselektrophorese (siehe S. 26) gereinigt. Die radioaktiven Substanzen wurden vom Papier eluiert und papierchromatographisch aufgetrennt (siehe S. 26).

b.) Kulturüberstand Die Hydrolyse von Glykosaminoglykanen bereitet einige Schwierigkeiten, da für die verschiedenen Zucker unterschiedliche Hydrolysebedingungen erforderlich sind. Die Hydrolyse am Ionenaustauschharz, obwohl für das Zellmaterial geeignet, führte beim Kulturüberstand nicht zum gewünschten Ergebnis. Daraufhin wurden auch stärkere Hydrolysebedingungen gewählt.

Vom dialysierten, lyophilisierten Kulturüberstand wurden 9000 cpm an markiertem Material in 150 μ l 2 N HCl aufgenommen und 2 1/2 Stunden im verschlossenem Glas bei 100°C inkubiert. Die Probe wurde mit Ag_2CO_3 neutralisiert. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde im Exsiccator über KOH getrocknet, mit 4 μ l 1% Zuckerlösung als Trägermaterial ergänzt und in 20 μ l H_2O aufgenommen. Dieses Gemisch wurde auf einem Papierchromatogramm getrennt (siehe S. 26).

Um die Säure-Hydrolyse zu erleichtern, wurde der (nicht dialysierte) Kulturüberstand zuerst enzymatisch abgebaut mit

- 1.) Pronase
- 2.) Hyaluronidase
- 3.) Glukuronidase

wie beschrieben (siehe S. 27). Der gesamte Ansatz wurde nach der Pronase-Behandlung gegen H_2O dialysiert bei 4°C. Nach jeder Enzymbehandlung wurde eine Probe vom Ansatz' über eine P100-Säule (siehe S. 28) gegeben, um den Abbau zu verfolgen.

Ursprünglich zum Entsalzen wurde der abgebaute Kulturüberstand über eine P2-Säule (siehe S. 28) gegeben. Jedoch zeigte das Elutionsprofil auch eine Auftrennung des Abbauprodukte (Abb. 20). Daraufhin wurde das Ausschlußmaterial (I), die Oligosaccharide (II-III) und das vermutliche Monosaccharid getrennt gesammelt, im Rotationsverdampfer eingengt und wie folgt weiterbehandelt.

Das Material von Gipfel I wurde in 20 μ l H_2O aufgenommen und 10 μ l davon in 500 μ l 1 N H_2SO_4 im verschlossenem Gefäß unter Stickstoff 3 Stunden bei 100°C hydrolysiert. Anschließend wurde die Probe mit BaCO_3 neutralisiert. Das Material von Gipfel II und III wurde ebenfalls in 20 μ l

H₂O aufgenommen und davon dann 10 µl in 500 µl 2 N HCl unter Stickstoff 3 Stunden hydrolysiert. Die Probe wurde mit Ag₂CO₃ neutralisiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert und das Präzipitat zweimal mit wenig H₂O gewaschen. Die Spülflüssigkeiten wurden zu dem ersten Überstand gegeben und im Exsiccator bis zur Trocknung eingeengt.

Anschließend wurde mit den Proben ein Hochspannungselektrophorese durchgeführt, die radioaktiven Substanzen von Papier eluiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (siehe unten).

2.) Auftrennung von Zuckergemischen

a.) Hochspannungselektrophorese

Elektrophorese-Apparatur: Savant Instruments

Papier: Whatman 1, 13,5 x 70 cm (oder 75 cm)

Elektrolyt: Pyridin/Eisessig/H₂O = 10/4/8,6 (v/v/v/
pH 5,3

Lauf: Stromstärke eingestellt auf 50 mA = 20-30 V/cm
für 2 Stunden

b.) Papierchromatographie

Papier: Whatman 1, 13,5 x 60 cm

Lösungsmittel: Pyridin/Butanol/H₂O = 4/6/3 (v/v/v)

Lauf: absteigend 48 Stunden

c.) Dünnschichtchromatographie

Platten: DC-Fertigplatten Cellulose 20 x 20 cm,

Schichtdicke 0,1 mm (Merck), vorlaufen lassen

Lösungsmittel: Essigsäureäthylester/Pyridin/Eisessig/
H₂O = 5/5/1/3 (v/v/v/v/)

Lösung zur Sättigung der Tankatmosphäre:

Essigsäureäthylester/Pyridin/H₂O = 40/11/6
(v/v/v)

Nach dem Trocken des Papiers bzw. der Platte wurde die Radioaktivität in der Funkenkammer lokalisiert (siehe S. 23). Danach wurde mit alkalischer Silbernitratlösung nach Trevelyan (72) angefärbt.

V. Charakterisierung der radioaktiven Glykokonjugaten

1.) Enzymbehandlung

a.) Pronase Dialysiertes Zellmaterial mit etwa 15000 cpm wurde mit 40 µg Pronase P (aus Streptomyces griseus, reinst, Serva) in 0,1 M Tris-HCl oder PBS bei pH 7,0 1-2 Tage bei 37°C inkubiert. Um Kulturüberstand (mit 5% Serum) vollständig abzubauen, mußte mit 1 mg Pronase/Ansatz 3 Tage unter Zugabe von Toluol oder Chloroform bei 37°C inkubiert werden.

b.) Hyaluronidase (E.C.3.2.1.35) Dieses meist aus Schafshoden gewonnene Enzym hydrolysiert endo-N-Acetylhexosamin-Bindungen von Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und zum Teil auch Dermatansulfat (73,74). Vom Zellmaterial wie vom Kulturüberstand wurden ca. 7000 cpm mit 800 Einheiten Hyaluronidase (Boehringer) in PBS mindestens 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Wurde die Probe zuvor mit Pronase behandelt, mußte diese vor der Zugabe von Hyaluronidase bei 100°C inaktiviert werden.

c.) Glukuronidase (E.C.3.2.1.31) Nach dem Hyaluronidase-Abbau sollte Glukuronidase von den Oligosacchariden endständige Glukuronsäuren abspalten. Dazu wurde das Enzym (aus E. coli, in 3,2 Ammoniumsulfat, Boehringer) mit 0,1 M Essigsäure, pH 4, 1:100 verdünnt und davon 30 µl zu dem vorverdauten Ansatz gegeben. Dieser wurde dann 30 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.) Gelfiltration

a.) P100-Säule

Säulenfüllung: Bio-Gel P100 (Bio-Rad), 100-200 mesh

Fraktionierungsbereich: 5000-100000 Dalton

Säule: 0,9 x 60 cm (Pharmacia)

Elutionsmittel: 0,2 M Pyridin - 0,1 M Essigsäure -
0,1% SDS

Elutionsgeschwindigkeit: 2 ml/Stunde

Fraktionsvolumen: 600 µl

b.) P2-Säule

Säulenfüllung: Bio-Gel P2, 200-400 mesh

Fraktionierungsbereich: 100-1800 Dalton

Säule: 0,9 x 30 cm (Pharmacia)

Elutionsmittel: 0,2 M Pyridin - 0,1 M Essigsäure

Elutionsgeschwindigkeit: 9,7 ml/Stunde

Fraktionsvolumen: 450 µl

An beide Säulen wurde ein peristaltische Pumpe (LKB 1200 Varioperpex) angeschlossen.

c.) Eichproben und Nachweis

Dextranblau 2000 (Pharmacia) - 0,4% NaCl Gemisch:

Nachweis der NaCl-haltigen Fraktionen durch Fällung
mit AgNO_3

^{14}C -Galaktose: Radioaktivitätszählung

Maltotriose: Nachweis durch Dische-Cystein-Reaktion
(75)

VI. Auftrennung von Glykosaminoglykanen

1.) Agarose-Gelelektrophorese

Zur Charakterisierung unterschiedlich saurer Glykosaminoglykanen diente die Agarose-Gelelektrophorese (76).

Gel: 0,9% Agarose (reinst, Serva) in 0,06 M Diäthylbarbitalpuffer, pH 8,6

Auftragung: mit 7 mm breiten Filterpapierstreifen (Whatman 3M) Rinnen ins Gel gestanzt, anschließend maximal 4 µl aufgetragen.

Referenzsubstanzen: Chondroitinsulfat (2 mg/ml)
Hyaluronsäure (2 mg/ml), enthielt Verunreinigung, die wie Chondroitinsulfat lief. (für biochemische Zwecke, Merck)

Elektrophorese-Apparatur: LKB 217 Multiphor
LKB 2103 Power Supply

Elektrolyt: 0,06 M Diäthylbarbitalpuffer, pH 8,6

Lauf: bei 150 V, 15-20 mA 1 Stunde (bis das zu den Proben gegebene Bromphenolblau ca. 3 cm gewandert)

2.) Fixieren und Anfärbung mit Alcianblau

Nach Ende des Laufes wurde das Gel für mindestens drei Stunden in eine 0,1% Cetavlon-Lösung (Cetyltrimethylammoniumbromid, Merck) gelegt, um die Glykosaminoglykane zu fixieren. Anschließend wurde das Gel mit einem in Cetavlon-Lösung befeuchteten Filterpapier (Whatman 3M) bedeckt und über Nacht bei etwa 40°C getrocknet.

Zum Anfärben der sauren Polysaccharide wurde Alcianblau verwendet (77), nachdem sich die Hyaluronsäure mit Toluidinblau nicht anfärben ließ. Das fixierte Gel wurde für

mehrere Stunden in folgende Farblösung gelegt:

0,5 g Alcianblau 8S (Roth) in
500 ml 10% Äthanol - 5% Essigsäure

Entfärbt wurde in der Lösung ohne Farbstoff, wobei der Hintergrund schwach blau gefärbt blieb.

3.) Radioaktivitätsverteilung

Sollte der Anteil der Radioaktivität in den verschiedenen Flecken der Probe quantitativ bestimmt werden, so wurden die Bahnen direkt nach dem Fixieren (ohne Trocknung) mit einem Gelschneider in ca. 1 mm breite Stücke geschnitten. Für die Radioaktivitätsbestimmung wurden die Gelstücke in 10 ml Scintillationsflüssigkeit aufgenommen, worin sie sich nach längerem Stehen (1 Stunde) auflösten.

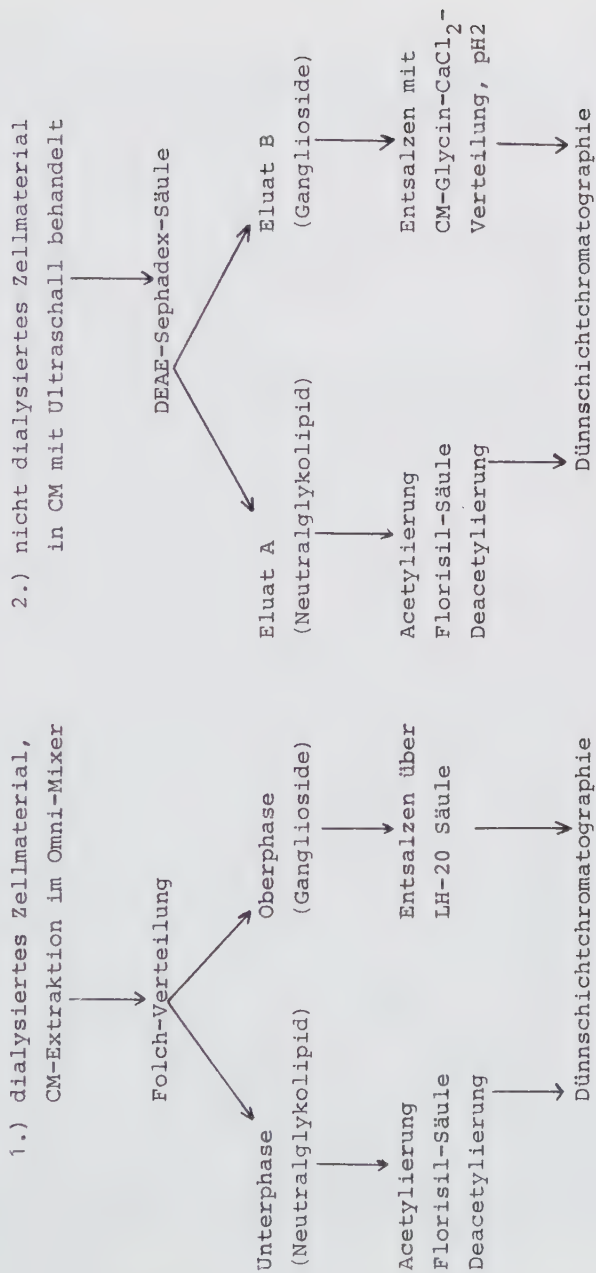
VII. Isolierung und Auftrennung von Glykolipiden

1.) Trennung der Neutralglykolipide und Ganglioside

Im Laufe dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, um aus dem Chloroform-Methanol Extrakt der Zellen Neutralglykolipide und Ganglioside zu trennen (siehe Schema 1). Die Trennung beruht bei der Folch-Verteilung (66) auf der unterschiedlichen Polarität bedingt durch den Oligosachharidanteil der beiden Glykolipideklassen. Dagegen werden über einem Ionenaustauscher Neutralglykolipide von Ganglioside aufgrund ihrer sauren Ladung getrennt.

a.) Folch-Verteilung (66) Der Chloroform-Methanol Extrakt wurde aus dialysiertem Zellmaterial gewonnen, wie zuvor beschrieben (siehe S.18). Für analytische Zwecke wurde die Folchverteilung insgesamt achtmal durchgeführt, um

Schema 1: Vergleich der zwei verwendeten Arbeitsmethoden zur Auftrennung von Glykolipiden



sicher zu gehen, das auch kurzkettige Ganglioside aus der apolaren Unterphase entfernt werden. Deshalb wurde nach der ersten Verteilung mit 1/5 Volumen 0,1 M KCl diese dreimal mit salzhaltiger und viermal mit salzloser theoretischen Oberphase (78) wiederholt. Jedoch können dabei langkettige Neutralglykolipide (mehr als 5 Zucker) in die Oberphase gelangen. Die Unterphase und die gesammelten Oberphasen wurden eingeeengt.

b.) Chromatographische Trennung über DEAE-Sephadex (79)

Der Chloroform-Methanol Extrakt von nicht-dialysiertem Zellmaterial wurde über eine DEAE-Sephadex-Säule getrennt. (Bei der Dialyse von sehr geringen Konzentrationen an Glykolipiden besteht die Gefahr ihres Verlustes.) Der Vorteil dieser Methode liegt in der besseren Trennung der kurzkettigen Gangliosiden (wie Hämatosiden) von den Neutralglykolipiden. Entscheidend für die Trennung ist die frische Zubereitung des Ionenaustauschers, der in die Acetat-Form überführt werden muß. Dazu wurden 11 g DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia) in 100 ml Solvent B (Chloroform-Methanol-0,8 M Acetat = 30/60/8) fünfmal gewaschen, d.h. mindestens 1 Stunde stehen gelassen und dann über einen Büchner-Trichter filtriert. Zum Schluß wurde das DEAE-Sephadex über Nacht in Solvent B stehen gelassen. Zur Entfernung der überschüssigen Acetat wurde der Ionenaustauscher dreimal mit Solvent A (Chloroform-Methanol-H₂O = 30/60/8) gewaschen und darin aufbewahrt.

Vor Gebrauch wurde dieses DEAE-Sephadex auf sein Trennungsvermögen getestet. Dazu wurde das Gel in eine Pasteur-Pipette gefüllt und 50 µg Rindergehirngangliosid wie 50 µg Globosid aufgetragen. Bei der Elution mit 5 ml Solvent A sollte nur das Neutralglykolipid (Globosid) im Eluat erscheinen. Das eingeeengte Eluat wurde auf einer Dünnschichtplatte aufgetrennt und mit Resorcin angefärbt (siehe S.37).

Es war kein Gangliosid im Eluat nachweisbar. Die Acetat-Form des DEAE-Sephadex ist nur begrenzt haltbar, zeigte in diesem Ansatz jedoch nach 9 Tagen bei Raumtemperatur noch keine Veränderung.

Im Versuch wurde für jede Probe eine Pasteur-Pipette mit DEAE-Sephadex gefüllt. Das eingeengte Zellmaterial wurde in 500 µl Solvent A aufgenommen, und unlösliches Material versucht mit Ultraschall zu homogenisieren. Die gesamte Probe wurde auf das Säulenbett gegeben und mit je 5 ml Solvent A und Solvent B langsam tropfend eluiert. Die Eluate A und B wurden getrennt aufgefangen und eingeengt.

2.) Auftrennung der Neutralglykolipide

Die Unterphase bzw. das Eluat A enthält nicht nur Neutralglykolipide sondern auch Phospholipide und nicht-polare Lipide wie Cholesterin, die abzutrennen sind.

a.) Acetylierung und Elution über Florisil (80) Nach der Acetylierung der Zucker können Neutralglykolipide von Phospholipiden und Cholesterin abgetrennt werden. Dazu wurde die eingeengte Probe zweimal in Toluol aufgenommen und P_2O_5 wasserfrei getrocknet. Anschließend wurde die Probe in 200 µl wasserfreiem Pyridin und in 100 µl Essigsäureanhydrid aufgenommen, unter N_2 verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Daraufhin wurde der Ansatz zweimal mit Toluol eingeengt, um Pyridin zu entfernen.

Für jede Probe wurde eine Pasteur-Pipette mit Florisil (SiO_2/MgO , für die Säulenchromatographie, Merck) gefüllt, das in Dichloräthan(DCE)-Hexan 4:1 aufgeschwemmt worden war. Die Probe wurde in 500 µl DCE-Hexan 4:1 aufgetragen und die Säule nacheinander eluiert mit je 5 ml folgender Lösungsmittel:

Lösungsmittel (v/v/v)	eluierte Substanz
1.) DCE-Hexan 4:1	Cholesterin
2.) DCE	---
3.) DCE-Aceton 1:1	acetylierte Neutralglykolipide
4.) DCE-Methanol-H ₂ O 2:8:1	Phospholipide

Eluate 1.), 2.) und 4.) wurden zur Radioaktivitätszählung in Scintillationsgläsern aufgefangen und die Lösungsmittel abgedampft. Die acetylierten Neutralglykolipide im 3. Eluat wurden in einem Spitzglas eingengt.

b.) Deacetylierung (80) Vor der weiteren Auftrennung mußten die acetylierten Neutralglykolipide in ihre ursprüngliche Form gebracht werden. Dazu wurde die Probe in 200 µl Chloroform-Methanol 2:1 aufgenommen und mit 10 µl 0,5% Na-Methylat (0,5 g metallisches Natrium in 1000 ml Methanol gelöst) 30 min im 50°C-Wasserbad inkubiert. Die katalytische Menge an Na-Methylat beeinträchtigte nicht die anschließende dünnschichtchromatographische Auftrennung.

c.) Dünnschichtchromatographie (78)

Platten: Kieselgel, 10 x 10 cm, Schichtdicke 0,24 mm
HPTLC, Merck

Lösungsmittel: Chloroform-Methanol-H₂O = 65/30/8 (v/v/v)
nur untere Phase

Referenzsubstanzen: Maushirn-Neutralglykolipid
Globosid aus menschlichen Erythrozyten (beide von G. Rosenfelder)

Nachweis der Glykolipide: 0,5% Orcin in 3 M H₂SO₄ bei 120-130°C

Mit Orcin konnte auch nach der Resorcin-Färbung (siehe S.36) angefärbt werden, jedoch nicht umgekehrt.

3.) Auftrennung der Ganglioside

a.) Entsalzen über LH-20-Säule (81) Nach der Folch-Verteilung enthielt die Oberphase neben den Gangliosiden auch Salz (KCl), das bei der dünnsschichtchromatographischen Trennung stört. Wie schon erwähnt, ist jedoch die Dialyse zum Entsalzen nicht geeignet. Nach einer Vorschrift von Maxwell und Williams (81) können Ganglioside über eine Sephadex LH-20-Säule entsalzt werden. Sephadex LH-20 wurde in aqua dest. aufgeschwemmt und nach fünfminütigem Absitzen das feine, oben schwimmende Material entfernt. Dieser Arbeitsgang wurde viermal wiederholt. Das Gel wurde dann über einen Büchner-Trichter filtriert und gut getrocknet. Anschließend mußte das Gel mindestens 48 Stunden in Chloroform-Methanol 3:1 equilibrieren.

Als Säule diente eine 5 ml-Pipette, die mit dem Gel bis zur 5 ml-Markierung gefüllt wurde. Das Gel hatte die Tendenz, in dem Lösungsmittel oben zu schwimmen. Für Vorversuche wurde ein Gemisch aus 200 µg Rindergehirngangliosid (in CM 1:1), eine kleine Spatelspitze trockenes KCl und ^{14}C -Galaktose (12500 cpm in 1 µl H_2O) aufgetragen. Eluiert wurde mit 10 ml Chloroform-Methanol 3:1, wobei die Elutionsgeschwindigkeit 100 µl/min nicht übersteigen durfte. Es wurden Fraktionen von 500 µl gesammelt. Von einem Aliquot jeder Fraktion wurde die Radioaktivität gezählt. Der Rest wurde eingeengt. Es zeigte sich, daß Ganglioside in den Fraktionen 5-11 eluiert wurden, während ^{14}C -Galaktose in den Fraktionen 13-17 erschien. KCl war in keinem Eluat nachweisbar.

Die eingeengte Oberphase der Folch-Verteilung enthielt einen beträchtlichen Salzzrückstand, der sich in 500 µl Chloroform-Methanol 3:1 auch mit Ultraschallbehandlung nur sehr schwer suspendieren ließ. Die Suspension (und

etwas Spülflüssigkeit) wurde auf eine frisch bereitete Säule aufgetragen und mit 10 ml Chloroform-Methanol 3:1 eluiert, wie oben beschrieben. Es wurden jedoch Fraktionen von 1 ml gesammelt und die Fraktionen 3-6(7) vereint. Es war möglich, sechs Proben nacheinander auf einer Säule zu entsalzen.

b.) Zweiphasen-Verteilung nach Carter und Kanfer (82) Um Ganglioside von Salz und niedermolekularem Zellmaterial (aus der nicht-dialysierten Probe) zu trennen, bot sich die Zweiphasen-Verteilung an. Sie beruht darauf, daß Ganglioside bei stark saurem pH-Wert mit Ca^{++} Komplexe bilden und daher in unpolare Lösungsmittel löslich sind. Das eingeeengte Eluat B (siehe S.33) wurde in 10 ml Chloroform-Methanol 2:1 aufgenommen und mit 2,5 ml 0,2 M Glycin-HCl, 100 mM CaCl_2 , pH 2,2 ausgeschüttelt. Der pH-Wert der Oberphase wurde mit pH-Papier nachgeprüft und gegebenenfalls mit HCl eingestellt. Zur schnelleren Phasentrennung wurde die Verteilung zentrifugiert. Die wässrige Oberphase, die das niedermolekulare Material und das Salz enthält, wurde möglichst quantitativ abgehoben. Interphasenmaterial wurde der Unterphase zugerechnet. Die Unterphase wurde noch viermal mit 2,5 ml des Glycin-Puffers ausgeschüttelt. Zum Schluß wurde die Unterphase von unten entnommen, um keine Kontamination durch die Oberphase zu erhalten. Die eingeeengte Unterphase enthielt reine Ganglioside als Ca^{++} -Komplex.

c.) Dünnschichtchromatographie (78)

Platten: Kieselgel, 10 x 10 cm, Schichtdicke 0,24 cm
HPTLC, Merck

Lösungsmittel: Chloroform-Methanol- H_2O (20 mg CaCl_2 /
100 ml) = 120/70/17 (v/v/v)

Referenzsubstanzen: Rindergehirngangliosid (Serva)
Gangliosid aus menschlichem Gehirn
Kalbsthymusgangliosid (beide von
G. Rosenfelder)

Nachweis der Ganglioside: 0,2% Resorcin in $\text{H}_2\text{O-HCl}$ 2:8
(v/v) (+ 0,25% 0,1 M CuSO_4
auf 100 ml)

mit Glasplatte bedeckt 10 min bei $140-160^\circ\text{C}$

ERGEBNISSE

I. Einbau radioaktiver Substanzen in Fibroblastenkulturen

A. Einfluß der Kulturbedingungen

1.) Versuch der Stimulierung mit Lipopolysaccharid

Um Zellzyklus-abhängigen Einbau von radioaktiven Substanzen verfolgen zu können, müssen die Fibroblastenkulturen synchronisiert werden. In Vorversuchen war daher zu klären, ob Lipopolysaccharid (LPS) ruhende Mäusefibroblasten zur synchronisierten DNS-Synthese stimulieren könnte, wie dies für sekundäre Hühnerfibroblasten beschrieben ist (83). Ein solches System hätte gegenüber der Stimulierung mit Serum (84) den Vorteil, daß die Anzahl nicht zu kontrollierender und unbekannter Komponenten, die im Serum enthalten sind, begrenzt wäre.

Um einen Überblick über den Verlauf des Zellwachstums zu erhalten, wurde in einem repräsentativen Versuch der Einbau von ^3H -Thymin in Trichloressigsäure-fällbare DNS von Fibroblastenkulturen verfolgt:

- a.) nach Transfer der konfluenten, ruhenden Zellen
- b.) nach Mediumwechsel der ruhenden Kultur
- c.) nach Zugabe von LPS zur ruhenden Kultur

Das Ergebnis ist in Abbildung 8 dargestellt.

a.) Schon der Transfer konfluenter, ruhender Fibroblasten stimuliert den synchronen Einbau von ^3H -Thymin, mit einem Maximum 36 - 48 Stunden nach der Aussaat.

b.) Mediumwechsel sowohl mit 5% wie mit 2,5% Serum stimuliert den synchronen Einbau von ^3H -Thymin. Das Maximum entspricht in der Höhe etwa dem ersten Maximum nach Transfer, erscheint

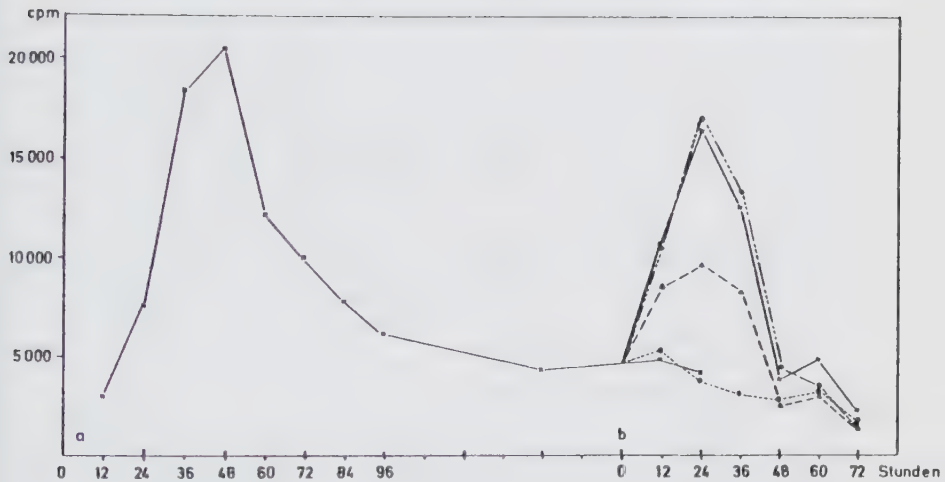


Abb. 8 Einbau von ^3H -Thymidin in Fibroblastenkulturen nach Transfer (a) und Mediumwechsel (b) mit Zugabe von:

- x — x — 2,5% Serum
- • — • — 2,5% Serum + 100 pg LPS
- ▲ — ▲ — 2,5% Serum + 1 ng LPS
- • — • — 100 pg LPS ohne Mediumwechsel

jedoch schon etwa 24 Stunden nach dem Mediumwechsel. Das spätere Maximum transferierter Kulturen mag dadurch erklärt werden, daß nach der Trypsinierung die Zellen sich erst absetzen und auf dem Substrat ausbreiten müssen, verbunden mit einer Neusynthese der abtrypsinierten Oberflächenkomponenten (85). Dieser Prozess dauert mehrere Stunden und verzögert wohl den Beginn der DNS-Synthese im Vergleich zu ruhenden Kulturen, die allein durch Mediumwechsel zum Wachstum stimuliert wurden.

c.) LPS in den Konzentrationen von 10 pg - 1 ng/ml Kultur bei Mediumwechsel mit 2,5% Serum übt keinen steigernden Einfluß auf den ^3H -Thymidin-Einbau aus, sondern scheint eher hemmend wirken zu können. LPS-Zugabe ohne Mediumwechsel stimulierte keinen Einbau von ^3H -Thymidin. Das kann jedoch auch an der Erschöpfung des Kulturmediums liegen.

Daraufhin wurden für die weiteren Versuche die Fibroblasten durch den Transfer konfluenter, ruhender Kulturen synchronisiert.

2.) Einfluß der Zelldichte

In Vorversuchen wurde geprüft, welchen Einfluß die ausgesäte Zelldichte auf die Synchronisation der Kultur hat. Dabei zeigte sich, daß bei einem Zelltitel von $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml Kulturmedium ($= 5 \times 10^4$ Zellen/cm²) sich das Maximum wesentlich verlängert gegenüber dem wenig höheren Zelltitel von $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml ($= 7,5 \times 10^4$ Zellen/cm²) oder mehr.

3.) Einfluß der Serumkonzentration

Um Fibroblastenkulturen besser zu synchronisieren, d.h. ein schärferes Einbaumaximum zu erhalten, wurde versucht, die Zellen nur während der ersten 24 Stunden nach Aussaat mit 10% Serum zu kultivieren. Diese Serumkonzentration sollte möglichst viele Zellen gleichzeitig zum Durchlaufen des Zellzyklus stimulieren (86). Nach 24 Stunden wurde dann durch Mediumwechsel die Serumkonzentration auf 2,5% herabgesetzt. Dadurch sollte die Wahrscheinlichkeit, daß weitere Zellen stimuliert werden, stark herabgesetzt werden. Zudem erleichtert eine geringere Serumkonzentration die Untersuchung des Kulturüberstandes und der Oberflächenkomponenten.

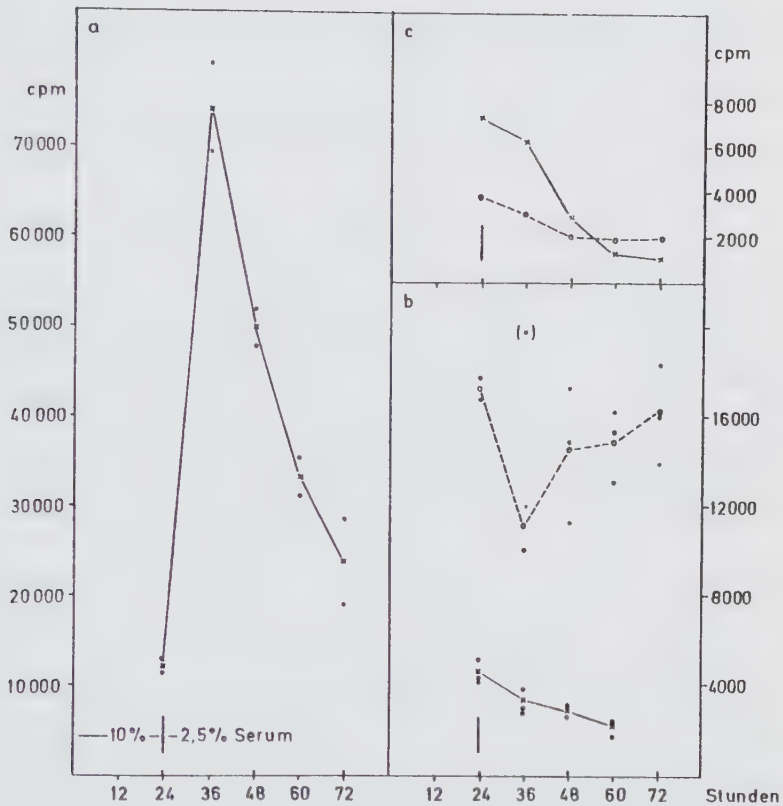


Abb. 9 Einbau von radioaktiven Vorstufen nach Verringerung der Serumkonzentration

a.) ^3H -Thymidin in Zellen

b.) ^{14}C -Galaktose und ^3H -Leucin in TCA-fällbares Zellmaterial

c.) ^{14}C -Galaktose und ^3H -Leucin in Kulturüberstand

(für b und c: ^{14}C -Galaktose (*—*), ^3H -Leucin (o-----o))

Unter diesen Kulturbedingungen sollten die Zellen nicht nur mit ^3H -Thymidin markiert werden, sondern auch doppelt markiert mit ^{14}C -Galaktose und ^3H -Leucin, um den Einbau in zelluläre und sekretierte Glykokonjugate und Proteine verfolgen zu können.

Abbildung 9 zeigt den unterschiedlichen Verlauf des Einbaus der verschiedenen radioaktiven Vorstufen unter diesen Kulturbedingungen. ^3H -Thymidin wird besonders gut eingebaut und zeigt ein scharfes Maximum. Die Inkorporation von ^{14}C -Galaktose in TCA-fällbares Zellmaterial und in sekretiertes Material nahm stetig ab, zeigt also kein mit dem ^3H -Thymidin-Einbau gleichzeitiges Maximum (Vergl. Abb. 11). Dagegen scheint der Einbau von ^3H -Leucin in die Zelle nach einem Minimum um 36 Stunden wieder anzusteigen.

Diese Experimente machen deutlich, wie kritisch die Kulturbedingungen, insbesondere die Serumkonzentration, für den Einbau von ^{14}C -Galaktose wie auch ^3H -Leucin, in embryonale Fibroblasten sind. Der zuletzt geschilderte Versuch läßt vermuten, daß der Einbau von ^3H -Thymidin in DNS und von ^{14}C -Galaktose in Glykokonjugate während des Zellwachstums in unterschiedlicher Weise von der Serumkonzentration abhängig sind. Weiterhin stehen diese Ergebnisse im Einklang mit der Vorstellung, daß bei Erreichen von Konfluenz bzw. Erschöpfung des Kulturmediums die Fibroblasten ihr Wachstum einstellen und in der G_1 -Phase des Zellzyklus verharren (87). Nach Aufhebung der Wachstumsinhibition (durch Transfer) werden die Zellen dazu stimuliert, synchron einen neuen Zellzyklus zu durchlaufen. Jedoch ist die Synchronisation abhängig sowohl von der Serumkonzentration wie der ausgesäten Zelldichte (87).

Die weiteren Versuche mit transferierten Fibroblasten wurden einheitlich mit 5% Serum durchgeführt.

B. Untersuchungen zum Zellzyklus

1.) DNS-Synthese und Zellzahl

Der Einbau von ^3H -Thymidin in synchronisierten Fibroblastenkulturen sollte die Phase der DNS-Synthese während des Zellzyklus kennzeichnen. Die Ergebnisse aus zahlreichen Versuchen, in Abbildung 10 und Tabelle 1 dargestellt, zeigen, daß ^3H -Thymidin hauptsächlich zwischen 36 und 48 Stunden nach Aussaat in TCA-fällbare DNS eingebaut wird. Je nach Versuch variierte der Zeitpunkt des Maximums, wobei keine Korrelationen zu Parametern, wie die Anzahl der Zelltransfers einer Kultur festgestellt werden konnte.

Mit der Einbaukinetik wurde auch die Zellzahl pro Kultur verfolgt, um durch die Zunahme der Zellzahl die Zeit der Zellteilung (M-Phase) feststellen zu können. Es wurde wiederholt beobachtet, daß die Zellzahl 24 Stunden nach Aussaat niedriger war als anfangs. Nach 48 Stunden Kultivation stieg die Zellzahl deutlich an (Abb. 10). Im Vergleich zu der Zellzahl nach 24 Stunden hatten sich nach 84 Stunden (3 1/2 Tagen) 65% der Zellen geteilt.

Abgesehen von der Ungenauigkeit bei der Verdünnung bzw. der eigentlichen Zellzählung, ist die Bestimmung der Zellzahl weiteren Fehlerquellen unterworfen:

- Verlust von Zellen durch Abnehmen des Kulturüberstandes und Spülen des Zellrasens. Dies gilt vor allem 24 Stunden nach Aussaat und während der Mitose, wenn die Zellen sich abrunden (88).

- Unvollständige Ablösung von der Petrischale oder Beschädigung der Zelle während des Trypsinierens.

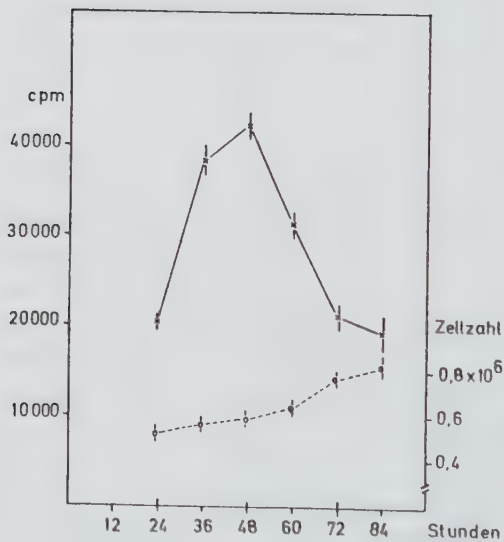


Abb. 10 Einbau von ^3H -Thymidin (x—x) und Zellzahl (o-----o).

2.) Synthese von Glykokonjugaten in der Zelle

Im Vergleich zum Einbau von ^3H -Thymidin sollte verfolgt werden, wann während des Zellzyklus verschiedene Glykokonjugate mit ^{14}C -Galaktose markiert werden. Zusätzlich sollten Fibroblasten mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markiert werden, um die Synthese von sulfatierten Glykosaminoglykanen zu verfolgen. Dazu wurden die Experimente in folgende Untersuchungsteile gegliedert:

- a.) Von ^{14}C -Galaktose/ ^3H -Leucin doppelt markierten Fibroblasten wurde der Einbau in TCA-fällbares Material verfolgt. Dieses Material dürfte Glykoproteine, Glycolipide und einen Teil der Glykosaminoglykane (89) enthalten. Dabei sollte der Einbau von ^3H -Leucin einen Hinweis auf die Proteinsynthese während des Zellzyklus geben.
- b.) Um den Einbau in Glycolipide zu verfolgen, wurden Kulturen mit ^{14}C -Galaktose markiert und mit Chloroform-Methanol extrahiert.
- c.) Der Einbau in Glykosaminoglykane wurde verfolgt, indem ^{14}C -Galaktose und $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markierte Zellen proteolytisch abgebaut und dialysiert wurden.

Für die Ergebnisse zu verschiedenen Zeiten wurden Häufigkeitsverteilungen aufgestellt. Dabei stellte sich heraus, daß die Ergebnisse für den Einbau von ^{14}C -Galaktose und auch von ^3H -Leucin in Zellmaterial in zwei Gruppen eingeteilt werden konnten: in Gruppe 1 mit hohen Einbauraten und Gruppe 2 mit niedrigeren Einbauraten. In Tabelle 1 sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen dargestellt. Die Unterschiede konnten als signifikant berechnet werden (siehe Legende zu Tabelle 1), doch müßten noch mehr Daten gewonnen werden, um dies zu bestätigen. In einigen Fällen wurde be-

Einbau	Gr. Nr. der Experimente	12 - 24 hr	24 - 36 hr	36 - 48 hr	48 - 60 hr	60 - 72 hr	72 - 84 hr
		cpm	cpm	cpm	cpm	cpm	cpm
		n	n	n	n	n	n
³ H-Thymidin	15,17,18	20398	38566	42573	31502	21153	19434
	28,29,30	±903	±2160	±2025	±2025	±1168	±1810
	31,32,33						
³ H-Leucin in Zellen	1 31,32,33	13151	16332	20722	17149	18151	17482
	34	±488	±158	±440	±837	±1326	±816
	2 28,29,30	6045	8007	8330	8583	8028	6193
		±784	±898	±1040	±727	±453	±442
¹⁴ C-Galaktose in Zellen	1 15,28,31	10748	19564	24065	17715	14154	12640
	32,33,34	±953	±1565	±1328	±1380	±2270	±1640
	2 18,29,30	5260	9282	7275	7275	5997	2007
		±630	±791	±631	±724	±323	
¹⁴ C-Galaktose in CM-Extrakt	1 28,31,33	1823	2331	3163	3887	3356	2906
		±627	±730	±984	±547	±247	±334
	2 29,30	1565	2424	1718	1824	1322	
		±187	±230	±126	±387	±246	
³ H-Leucin in Kulturüberstand	29,30,33	4991	5933	5360	5656	5017	4738
	34	±488	±716	±635	±495	±442	±619
¹⁴ C-Galaktose i. Kulturüberst.	1 31,34	28826	26599	22939	18782	16013	13333
	2 15,29,30	5919	8085	7222	6318	3533	2395
	33	±1071	±1241	±1146	±1032	±772	±923
Zellzahl/Kultur	15,17,28	0.52	0.57	0.59	0.64	0.78	0.82
	29,30,31	±0.04	±0.03	±0.02	±0.03	±0.04	±0.05
	32,33,34						

Tabelle 1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Einbauversuche. Gr.: Gruppe. n: Anzahl der Daten. Angegeben sind die Standardabweichungen. Signifikanz berechnet: $3S_d$ (Differenz der Mittelwerte)

obachtet, daß verschiedene Teile eines Experiments (z.B. Exp. 33) in unterschiedliche Gruppen einzuordnen waren.

Eine Überprüfung der kontrollierbaren Kulturbedingungen der Versuche ergab, daß Unterschiede im Medium, des gelieferten Serums, der Zugabe der radioaktiven Vorstufen und Schwankungen in der Zellzahl keine schlüssige Erklärung für dieses Ergebnis bieten. Zudem wurden diese Unterschiede im Einbau von ^3H -Thymidin nicht beobachtet. Eine mögliche Erklärung ist, daß Unterschiede in Zelldichte und den Zeiten zwischen den Transfers das weitere Wachstum beeinflussen können (24).

Im Folgenden soll die Einbaukinetik in verschiedene Glykokonjugate der Zelle und des Kulturüberstandes erläutert werden.

a.) Einbau von ^{14}C -Galaktose und ^3H -Leucin in TCA-fällbares Material. Der Einbau von ^{14}C -Galaktose in TCA-fällbares Material kann nur einen Hinweis auf die radioaktive Markierung der gesamten Glykokonjugate geben, da nicht bekannt ist, zu welchem Teil TCA die Glycolipide und Glykosaminoglykane zusammen mit den Glykoproteinen fällt. Durch Versuche mit abbauenden Enzymen (S. f.) wurde jedoch gezeigt, daß alle drei Glykokonjugatklassen mit ^{14}C -Galaktose markiert werden.

Die Einbaukinetik von ^{14}C -Galaktose (Abb.11) zeigte in beiden Einbaugruppen etwa den gleichen Verlauf wie der Einbau von ^3H -Thymidin, auch wenn die Maxima zeitlich um einige Stunden divergierten. Insgesamt wird ^{14}C -Galaktose also bevorzugt während der S-Phase eingebaut.

Die Einbaukinetik von ^3H -Leucin (Abb.11) in (Glyko-)Proteine hatten nur in Gruppe 1 ein deutliches Maximum während der S-Phase, und oft auch ein zweites Maximum bei 72 Stunden. Dagegen zeigt die Einbaukinetik der Gruppe 2 von Versuch

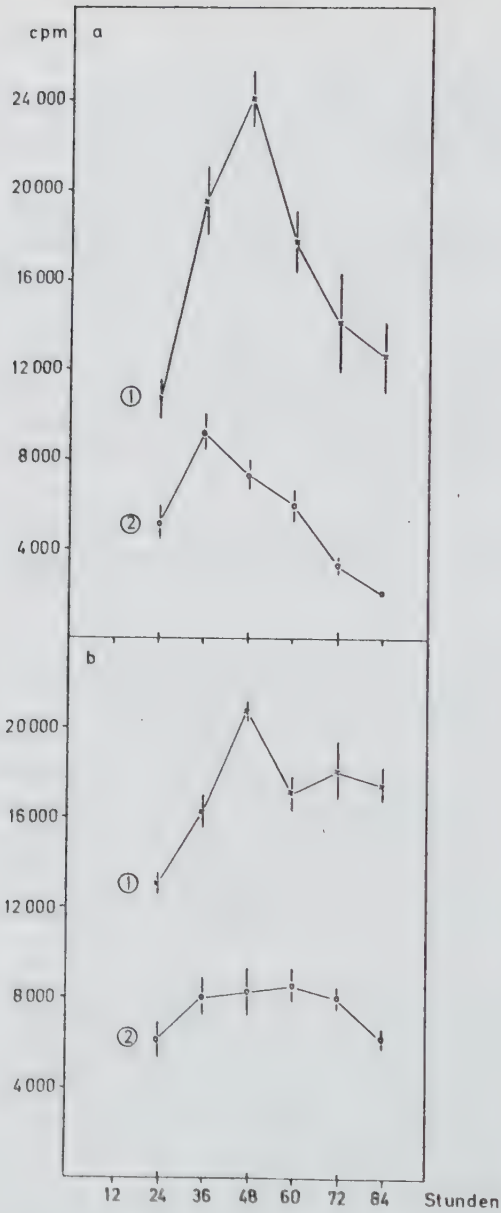


Abb. 11 Einbau von ^{14}C -Galaktose (a) und ^3H -Leucin (b) in TCA-fällbares Zellmaterial. An den Kurven ist die Nummer der Gruppe angegeben.

zu Versuch starke Variationen, so daß kein einheitliches Maximum erkennbar war.

b.) Einbau von ^{14}C -Galaktose in Glykolipide Glykolipide, die charakteristische Bestandteile der Plasmamembran sind, enthalten in ihrem Oligosaccharidteil meist auch Galaktose. Erwartungsgemäß wurde ^{14}C -Galaktose in Chloroform-Methanol-extrahierbares Zellmaterial eingebaut (jedoch kann dabei ein Teil der Galaktose in Glukose umgewandelt worden sein (90)). Nur ein Drittel bis ein Fünftel der Radioaktivität ist in dieser Fraktion zu finden im Vergleich zum TCA-fällbaren Zellmaterial.

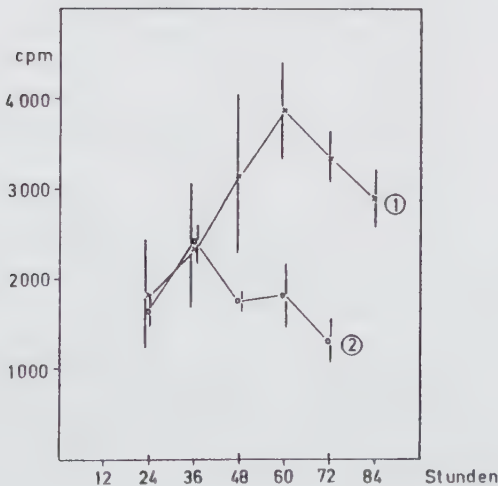


Abb. 12 Einbau von ^{14}C -Galaktose in Chloroform-Methanol-extrahierbares Zellmaterial (Glykolipide)

Die Einbaukurven der Gruppe 1 und 2 zeigten deutliche Unterschiede: Am Anfang verliefen beide Einbaukurven gleich. Dabei erreichte Gruppe 2 Das Maximum schon nach 36 Stunden, während das Maximum der Gruppe 1 bei 60 Stunden lag. Jedoch wurden bei zwei Versuchen Einbaukurven mit beiden Maxima gefunden.

Das Chloroform-Methanol extrahierte Material konnte durch eine Folch-Verteilung in neutrale Glykolipide und Ganglioside aufgeteilt werden. Danach enthielt die Oberphase mit den Gangliosiden etwa 40% der Radioaktivität. Obwohl die Einbaukinetik in der Unterphase und Oberphase während des Zellzyklus parallel verlief, schien der Anteil der Ganglioside von 36% auf 43% stetig zu steigen (Tab. 2).

Inkubation mit ¹⁴ C-Galaktose	% cpm $\pm$ S
12-24 Stunden	37,2 $\pm$ 1,5
24-36 "	38,0 $\pm$ 1,2
36-48 "	40,5 $\pm$ 1,7
48-60 "	41,4 $\pm$ 1,4
60-72 "	43,2 $\pm$ 1,6
72-84 "	43,1 $\pm$ 1,3

Tabelle 2 Anteil der radioaktiv markierten Glykolipide in der Oberphase nach Folchverteilung (Ganglioside) während der Kultivationszeit. S: Standardabweichung (n = 7)

c.) Einbau von ^{14}C -Galaktose und $^{35}\text{SO}_4^{--}$ in Glykosaminoglykane Um die Synthese von Glykosaminoglykanen während des Zellzyklus zu verfolgen, wurden Fibroblastenkulturen sowohl mit ^{14}C -Galaktose als auch mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markiert. Dieser Versuch erlaubt eine Unterscheidung zwischen der Markierung sulfatierter und nicht-sulfatierter Glykosaminoglykanen. Das Zellmaterial wurde mit Pronase verdaut, um vor allem die Glykoproteine abzubauen. Nach der Dialyse wurde die Radioaktivität gezählt.

(Bei der Gelfiltration dieses Materials über eine P100-Säule (siehe S. 74) zeigte sich jedoch, daß nur 40% der nicht-dialysierbaren ^{14}C -Markierung und 60% der $^{35}\text{SO}_4^{--}$ -Markierung (nicht gezeigt) nach der Pronase-Behandlung im Ausschlußvolumen erscheint. Nur dieses Material entsprach den hochmolekularen Glykosaminoglykanen und wurde bei der Auswertung berücksichtigt. Auf Grund der Radioaktivitätsbilanz nach der Agarose-Gelelektrophorese darf angenommen werden, daß sich das Verhältnis der radioaktiven Markierung von Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen während der beobachteten Zeiten nicht wesentlich veränderte.)

In Abbildung 13 ist das Ergebnis aufgezeichnet. Der Verlauf der Einbaukinetik von ^{14}C -Galaktose in Glykosaminoglykane entsprach etwa dem des in TCA-fällbaren Zellmaterials (Vergl. Abb. 11, Gruppe 2). Der Einbau von $^{35}\text{SO}_4^{--}$ verläuft anfangs parallel dazu, erfährt jedoch gegen Ende der Kultivationszeit einen Anstieg, im Gegensatz zum Abfall der ^{14}C -Markierung. Dies ist vermutlich bedingt durch sich ändernde Kulturbedingungen (wie z.B. erhöhte Zelldichte). Es sei hier erwähnt, daß ^{14}C -Galaktose drei Klassen von Glykosaminoglykanen und $^{35}\text{SO}_4^{--}$ nur zwei (sulfatierte) Klassen markiert (Vergl. Abb. 29).

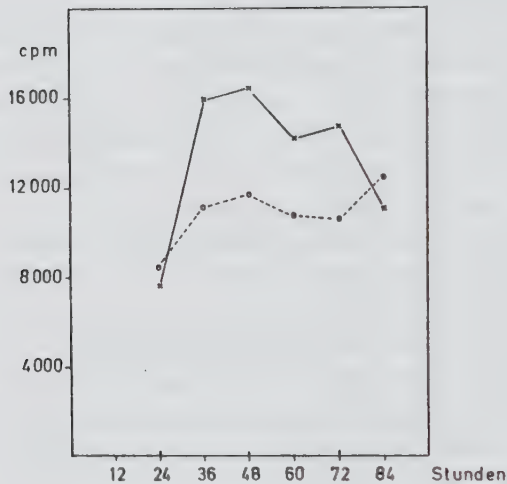


Abb. 13 Einbau von ^{14}C -Galaktose (x—x) und $^{35}\text{SO}_4^{--}$ (•-----•) in zelluläre Glykosaminoglykane

3.) Radioaktive Markierung der Glykokonjugate, die ins Kulturmedium abgegeben werden

Glykoproteine und Glykosaminoglykane sind nicht nur in der Zelle lokalisiert, sondern werden auch ins Kulturmedium ausgeschieden (91-94). Im folgenden Teil sollte untersucht werden, ob die radioaktive Markierung der Glykokonjugate im Kulturmedium Zellzyklus-abhängig ist.

a.) Einbau von ^{14}C -Galaktose und ^3H -Leucin. Von den mit ^{14}C -Galaktose und ^3H -Leucin markierten Fibroblasten wurde der Kulturüberstand dialysiert und die Radioaktivität gezählt. Das nicht-dialysierbare Material besteht aus Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen (siehe S. 74f.).

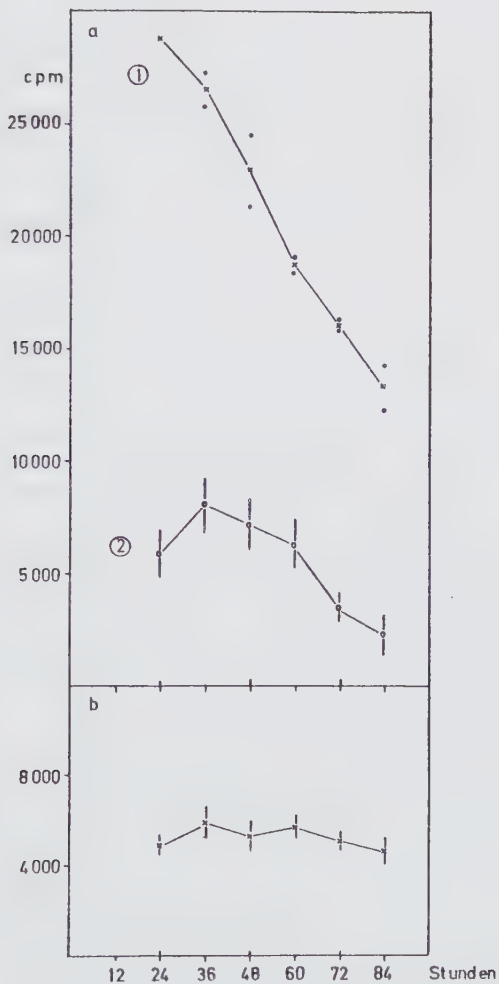


Abb. 14 Einbau von ^{14}C -Galaktose (a) und ^3H -Leucin (b) in dialysierten Kulturüberstand.

Die Ergebnisse des Einbaus von ^{14}C -Galaktose (Abb. 14) können ebenfalls in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Kinetik der Gruppe 1 zeigt von 12 bis 84 Stunden eine stetige und starke Abnahme, das Maximum liegt vermutlich schon bei der ersten Markierungsperiode. Dagegen verläuft die Einbaukinetik der Gruppe 2 wie die des TCA-fällbaren Zellmaterials der Gruppe 2 (Abb. 11), d.h. das Maximum liegt in der S-Phase.

Die Einbaurrate von ^3H -Leucin in Substanzen des Kulturüberstandes ist zu allen Markierungszeiten gleich.

b.) Einbau von ^{14}C -Galaktose und $^{35}\text{SO}_4^{--}$ in Glykosaminoglykane Wie schon für das Zellmaterial beschrieben (S. 51), wurde der mit ^{14}C -Galaktose und $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markierte Kulturüberstand mit Pronase abgebaut und dialysiert. (Nach der Gelfiltration über eine P100-Säule zeigte sich, daß von der ^{14}C -Markierung nur etwa 84% der Radioaktivität dem hochmolekularen Glykosaminoglykanen entspricht. Der Rest besteht aus nicht-dialysierbaren Glykopeptiden, die vermutlich aus Glykoproteinen stammen (siehe Abb. 19).)

Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt. Der Einbau von ^{14}C -Galaktose in (sulfatierte und nicht-sulfatierte) Glykosaminoglykane entspricht der Einbaukinetik des gesamten von der Zellen abgegebenen Materials der Gruppe 1. Die Markierung sulfatierter Glykosaminoglykane mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ zeigt während des Zellzyklus keine Veränderungen.

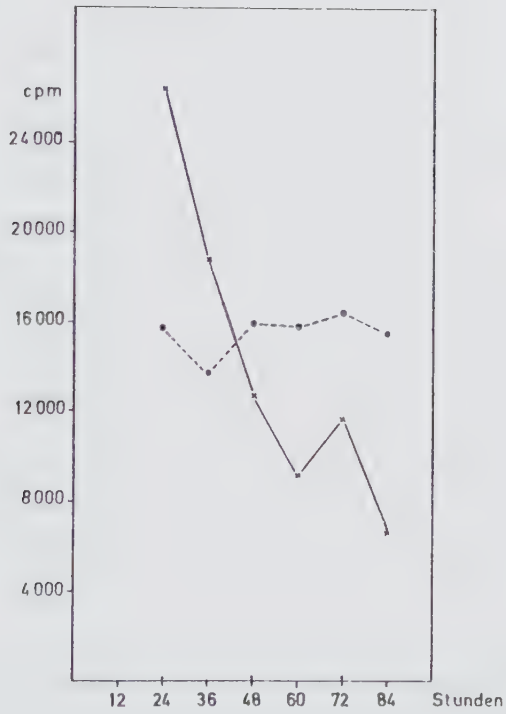


Abb. 15 Einbau von ^{14}C -Galaktose (x—x) und $^{35}\text{SO}_4^{--}$ (o-----o) in Glykosaminoglykane im Kulturüberstand

C. Diskussion

In dieser Untersuchung sollte bei embryonalen Mäusefibroblasten die Synthese von Glykoproteinen, Glykosaminoglykanen und Glykolipiden während des Zellzyklus verfolgt werden. Um einen möglichst umfassenden Überblick zu gewinnen, sollten sowohl zelluläre wie sekretierte Glykokonjugate untersucht werden. Embryonale Fibroblasten eignen sich besser für die Problemstellung als Zell-Linien, da sie sich weniger von den entsprechenden Zellen in vivo unterscheiden dürften. Wie schon in der Einleitung erwähnt, zeigen Zell-Linien oft gravierende morphologische und wachstumsphysiologische Veränderungen. Ein weiterer Vorteil der embryonalen Fibroblasten ist, daß sie eine ausgeprägte Wachstumshemmung nach Erreichen der Konfluenz zeigen und dadurch ohne tiefgehende Eingriffe in den Zellstoffwechsel synchronisiert werden können. Die Synchronisation der Fibroblasten hat den Nachteil daß abtryspierte Zellen etwa 12 Stunden benötigen, um ihre ursprüngliche Form auf dem Substrat anzunehmen (88).

Viele "normale" wie transformierte Zell-Linien bedürfen anderer Synchronisationsmethoden, die jedoch in den Ablauf des Zellzyklus eingreifen können. Für eine der gebräuchlichsten Methoden, der "double thymidine block" (bei der hohe Konzentrationen von Thymidin die DNS-Synthese hemmen), wurde beschrieben, daß die G₁- und G₂-Phasen verkürzt sind (95). Andere Methoden, die oft ergänzend verwendet werden, sind "mitotic selection" und "isoleucine deprivation" (40, 96). In der Zonenzentrifugation können Zellen (in Suspension) auf Grund zunehmender Größe während des Zellzyklus getrennt werden (33).

Wie aus den anfangs geschilderten Versuchen hervorgeht, sind die Kulturbedingungen entscheidend für die Reproduzierbar-

keit der Einbaukinetik insbesondere von ^{14}C -Galaktose im Vergleich zu der von ^3H -Thymidin. Wahrscheinlich werden DNS-Synthese und die Synthese von Oberflächenkomponenten wie Glykolipide, Glykoproteine und Glykosaminoglykanen von z.T. verschiedenen (Serum-) Faktoren reguliert. Dies zeigte sich einmal dadurch, daß nach der Verringerung der Serumkonzentration von 10% auf 2,5% (siehe Abb. 9) der Einbau von ^3H -Thymidin nicht negativ beeinflusst wurde. Dagegen zeigte der Einbau von ^{14}C -Galaktose in die Zelle und in sekretiertes Material des Kulturüberstandes eine stetige Abnahme, ohne das sonst zu beobachtende Maximum durchlaufen zu haben. Zum anderen dürften wachstumsregulierende Faktoren, die vielleicht nicht nur auf einen Zellzyklus wirken, die Erklärung für die zwei Einbaugruppen bieten. Die Entkopplung der DNS-Synthese von cytoplasmatischen und Membran-gebundenen Prozessen kann auch aus anderen Versuchen geschlossen werden (38, 97-99). Dabei kann derselbe Stimulus (z.B. "mouse epidermal growth factor") verschiedene zelluläre Prozesse (neben DNS-Synthese auch die Synthese von Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen) aktivieren (38,100).

Von den Kulturbedingungen ist die Rolle des Serums am besten untersucht worden. Neben der schon beschriebenen Notwendigkeit bei der Stimulierung zum Wachstum in der G_1 -Phase (86), sind Serumfaktoren auch zur Verankerung der Zelle zum Substrat (19) und während des weiteren Zellzyklus erforderlich (6). Entzug von Serum hat eine Abnahme der RNS-Synthese und der Aktivitätsverlust des Elongationsfaktor I für die Proeinsynthese zur Folge (101,102).

In dieser Arbeit wurde der Einbau verschiedener radioaktiver Vorstufen in synchronisierte Fibroblasten verfolgt, zunächst auch, um zu untersuchen, ob die an Zell-Linien gewonnenen Ergebnisse auf dieses Kultursystem übertragbar sind. Da sich die meisten Untersuchungen auf nur eine oder zwei Sub-

stanzklassen beschränken, wurde darüberhinaus versucht, die Synthese dreier Glykokonjugatklassen während des Zellzyklus zu vergleichen.

Der Einbau von ^{14}C -Galaktose in zelluläre Glykoproteine (TCA-Fällung) embryonaler Fibroblasten erfolgte maximal während der S-Phase. Dies stimmt überein mit Einbauversuchen bei denen ^3H -Glukosamin und ^3H -Fukose im Mauslymphoma-Zellen und ^{14}C -Galaktose in eine humane Krebszell-Linie eingebaut wurde (63,64)

Keine Übereinstimmung zwischen verschiedenen Autoren findet sich über die Zeit der Proteinsynthese während des Zellzyklus. Die eigenen Ergebnisse und die von Bosmann und Winston (63) lassen auf maximale Synthese während der S-Phase schliessen. Dagegen beobachteten Chatterjee et al. (64) eine konstante Syntheserate über den gesamten Zellzyklus bis auf einen steilen Anstieg während der M- bis frühen G_1 -Phase. (In beiden der zitierten Fällen sind die G_2 -M- G_1 -Phasen sehr kurz.)

Der Einbau von ^{14}C -Galaktose in die Glykolipide, sowohl in Ganglioside wie Neutralglykolipide, embryonaler Fibroblasten hat anscheinend zwei Einbauphasen während des Zellzyklus: ein erstes bei 36 Stunden (während der S-Phase), das andere bei 60 Stunden (G_2 - oder M-Phase) (Abb. 12). Ungeklärt bleibt dabei, warum in manchen Versuchen beide Maxima auftreten, in anderen Versuchen jedoch nur entweder das frühere oder das spätere.

Allerdings sind in der Literatur Befunde für die Synthese von Glykolipiden früh im Zellzyklus (G_1 -S-Phase) wie auch später (G_2 -M-Phase) beschrieben. Bosmann und Winston (63) fanden, daß ^{14}C -Glukosamin und ^3H -Fukose wie auch ^{14}C -Cholin vorwiegend in der G_2 -M-Phase in Chloroform-Methanol

lösliches Zellmaterial inkorporiert werden. Dagegen fanden Chatterjee et al. (64) den maximalen Einbau von ^{14}C -Galaktose in Glykolipid während der M- bis frühen G_1 -Phase. Lingwood und Thomas (103) berichteten für Mausmastocytoma-Zellen, daß während ^3H -Fukose bevorzugt in der G_2 -Phase in Glykolipide eingebaut wird, der Einbau von ^{14}C -Cholin in Phospholipide zwei Maxima während der S- und G_2 -Phase zeigt.

Pasternak et al. beobachteten, daß das Verhältnis Zucker/Protein in der Plasmamembran (ebenfalls von Mastocytoma-Zellen) während der G_1 - und in der G_2 -Phase maximal war (31, 34). Dies ist im guten Übereinstimmung mit der Zunahme der serologisch nachweisbaren Histolompatibilitätsantigenen während der G_1 -Phase (33).

Die Synthese von zellulären Glykosaminoglykanen zeigte einen Verlauf, der dem Einbau von ^{14}C -Galaktose in TCA-fällbares Zellmaterial glich, d.h. ein Maximum während der S-Phase. Jedoch gibt es dabei Unterschiede zwischen den nicht-sulfatierten und sulfatierten Glykosaminoglykanen (siehe Abb. 15). (Darauf wird in einem der folgenden Kapitel S.88 eingegangen.) Dagegen wurde bei NIL-Zellen (Hamster) zelluläre, mit ^3H -Glukosamin markierte Glykosaminoglykane zu allen Zeiten des Zellzyklus etwa in gleichen Mengen synthetisiert (104).

Die Sekretion von Glykosaminoglykanen ins Kulturüberstand zeigte eine starke Abnahme und war in seinem Verlauf ähnlich der Sekretion des gesamten mit ^{14}C -Galaktose markierten Materials (Abb. 14) Dagegen wurden sulfatierte Glykosaminoglykane zu allen Zeiten - bis auf ein Minimum in der S-Phase - mit insgesamt gleichbleibender Sulfatierung sekretiert. Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit den Befunden von Kraemer und Tobey, die zeigten, daß als Heparansulfat charakterisiertes Material kurz vor der Mitose von CHO-Zellen (Hamster) abgegeben wird (40).

II. Biochemische Untersuchungen der radioaktiv markierten Glykokonjugate

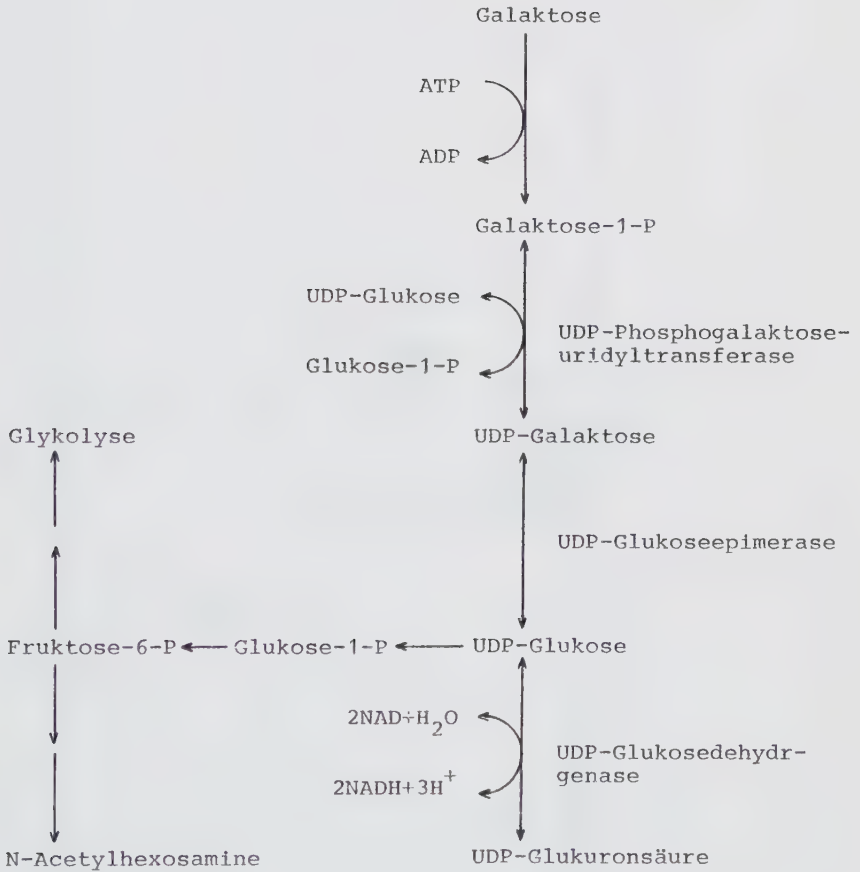
A. Identifizierung des radioaktiven Zuckers

Nach der Aufnahme durch die Zelle kann Galaktose durch verschiedene Stoffwechselwege verändert bzw. umgewandelt werden (siehe Schema 2). Es sollte untersucht werden, ob ^{14}C -Galaktose als solche in die Glykokonjugate inkorporiert worden war, oder ob sie in eine andere Verbindung umgewandelt worden war. Dazu wurde das gesamte radioaktiv markierte Zellmaterial wie auch der Kulturüberstand von diesen Zellen hydrolysiert und versucht, den radioaktiven Zucker zu identifizieren.

1.) Zellmaterial

Um primär die Neutralzucker zu untersuchen, wurde das homogenisierte, dialysierte Zellmaterial lyophilisiert und mit DOWEX in 0,1 N HCl hydrolysiert. Die Auftrennung des Hydrolysats in der Hochspannungselektrophorese ergab mehrere radioaktive Flecken (Abb. 16). Um die quantitative Verteilung der Radioaktivität zu bestimmen, wurde die Bahn bis auf den Startbereich in 0,5 cm breite Papierstreifen geschnitten und jeder Streifen im Scintillator gezählt. Die Radioaktivität verteilte sich zu 70% auf den Neutralfleck, zu 19% auf basische und zu 10% auf saure Flecken.

Das radioaktive neutrale Material wurde vom Papier eluiert und papierchromatographisch aufgetrennt (Abb. 17). Daraufhin verteilte sich die Radioaktivität vorwiegend über zwei Flecke, die das Laufverhalten von Galaktose und Glukose hatten: zu etwa 80% in Galaktose und zu 20% in Glukose. Es konnte also gezeigt werden, daß die radioaktive Markierung des hochmolekularen Zellamterials zum größten Teil in



Schema 2

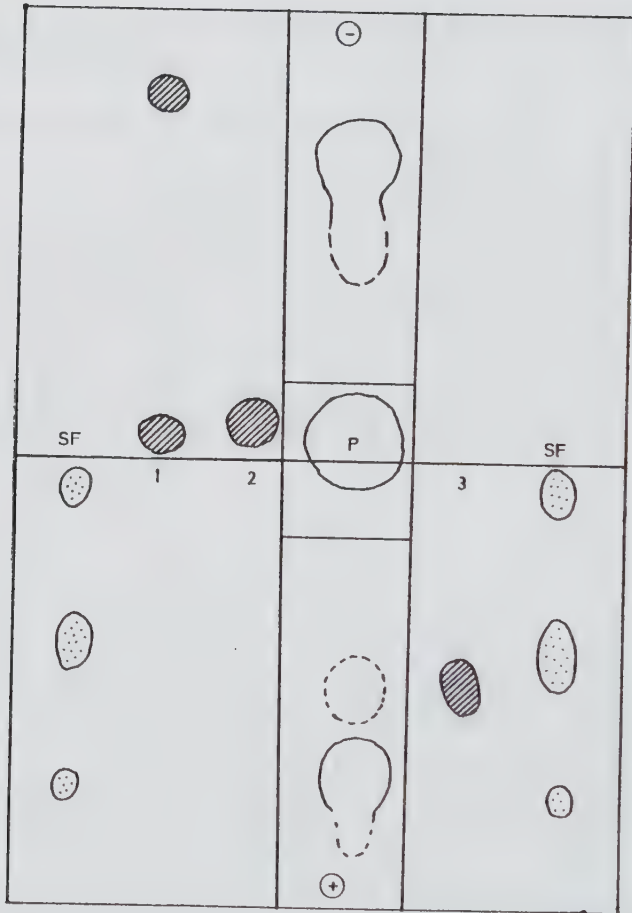


Abb. 16 Hochspannungselektropherogramm des mit ^{14}C -Galaktose markierten und hydrolysierten Zellmaterials.
(1): Neutralzucker- und Hexosamin-Gemisch
(2): Glukuron- γ -laktone
(3): N-Acetylneuraminsäure
(P): radioaktives Hydrolysat
(SF): Säurefuchsin

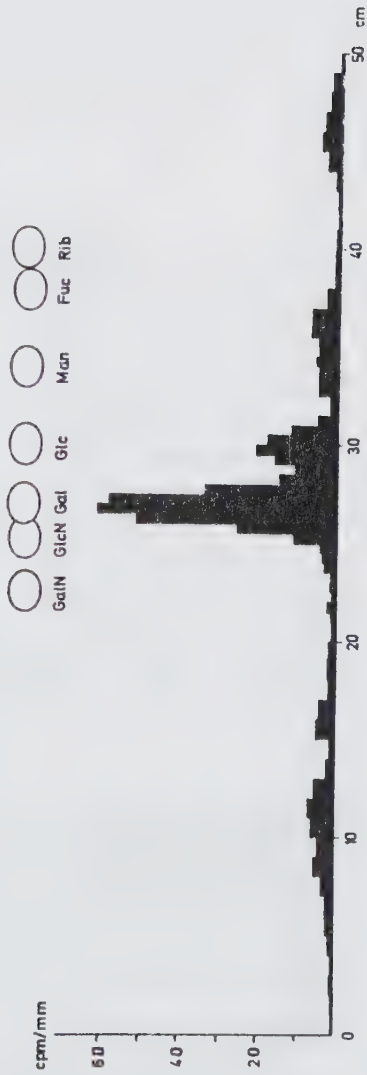


Abb 17 Papierchromatogramm der Neutralzucker nach Hochspannungselektrophorese (Abb.16) des radioaktiv markierten Hydrolysats

der Galaktose erhalten bleibt. Nur zum geringen Anteil wurde ^{14}C -Galaktose in Glukose und eventuell auch in Glukuronsäure (die im folgenden Absatz näher untersucht wird) umgewandelt. Radioaktive Aminosucker konnten nicht nachgewiesen werden.

2.) Kulturüberstand

a.) Hydrolyse mit 2 N HCl Polysaccharide mit einem hohen Anteil an Aminosuckern (wie Glykosaminoglykane) erfordern stärkere Hydrolysebedingungen, da die Aminogruppe die glykosidische Bindung stabilisiert. So wurde der dialysierte Kulturüberstand mit 2 N HCl hydrolysiert und anschließend papierchromatographisch aufgetrennt. Wie in Abbildung dargestellt, verteilte sich die Radioaktivität auf hauptsächlich zwei Flecken. Dabei ist nur ein relativ geringer Teil der Radioaktivität in dem Flecken der Galaktose und fast keine in dem bei der Glukose. Die meiste Radioaktivität wandert im Bereich der Glukuronsäure. Aber auch (unvollständig hydrolysierte Oligosaccharide könnten in diesem System ähnlich laufen. Andere Trennmethoden des hydrolysierten Kulturüberstandes waren deshalb zur Identifizierung nötig.

b.) Enzymatische Hydrolyse und anschließende saure Hydrolyse
Auf Grund der obigen Ergebnisse, wurde vermutet, daß ^{14}C -Galaktose vorwiegend in Form der Glukuronsäure die Glykosaminoglykane radioaktiv markiert. Da Glykuronsäuren gegenüber sauren Hydrolysebedingungen nicht sehr beständig sind, wurde versucht, die Polysaccharide zuerst enzymatisch abzubauen.

Nach Pronase-Behandlung und Dialyse, um Serumprotein und niedermolekulares Material zu entfernen, zeigte die ^{14}C -Markierung nach der Gelfiltration über eine P100-Säule



Abb. 18 Papierchromatogramm des mit ^{14}C -Galaktose markierten und hydrolysierten Kulturüberstandes

folgendes Elutionsmuster (Abb. 19): 83% der Radioaktivität befand sich im Ausschlußmaterial, 10% in einem Bereich mittlerer, nicht dialysierbaren Molekülgröße. Anschließend wurde mit Hyaluronidase (E.C.3.2.1.35) behandelt, einem Enzym, das spezifisch Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat abbaut. Als Abbauprodukte entstehen Okta- und Tetrasac-

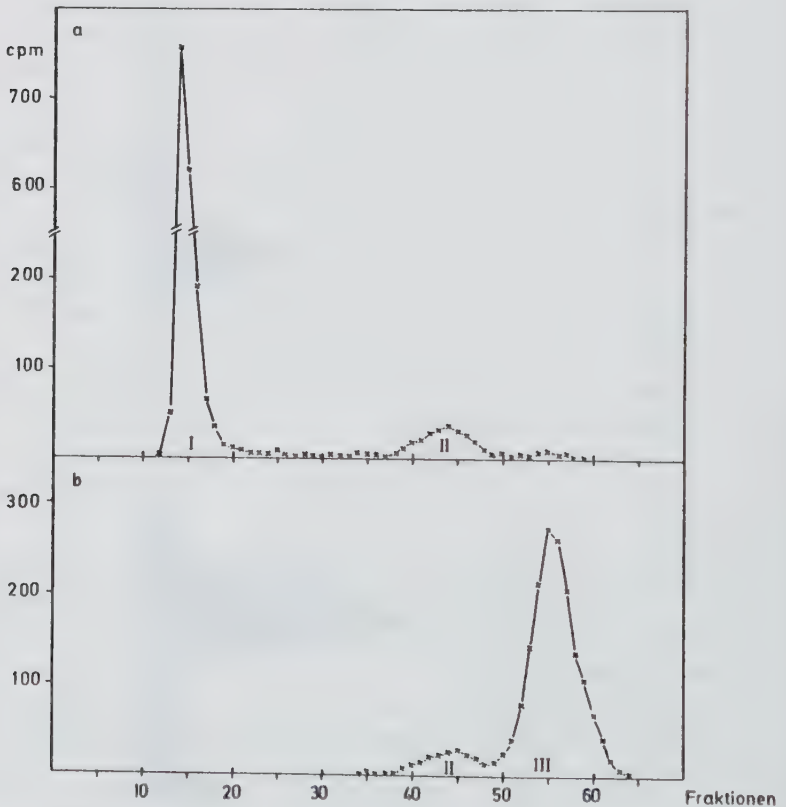


Abb. 19 Elutionsmuster von ^{14}C -markiertem Kulturüberstand nach Pronase-Behandlung und Dialyse (a) und nach anschließender Behandlung mit Hyaluronidase (b) über eine P100-Säule. I: Glykosaminoglykane II: Glypeptide III: Abbauprodukte der Glykosaminoglykane

charide. Daraufhin erschien bei der Gelfiltration das ursprünglich hochmolekulare radioaktive Material quantitativ im niedermolekularen Bereich, während der Gipfel II unverändert blieb. Um die terminale Glukuronsäure von den Abbauprodukten des Hyaluronidase-Abbaus abzuspalten, wurde schließlich mit Glukuronidase (E.C.3.2.1.31) behandelt.

Zum Entsalzen wurde das gesamte Material über eine P2-Säule gegeben. Das Elutionsmuster (Abb. 20) ergab mehrere Gipfel: Im Ausschlußmaterial war 14% der Radioaktivität enthalten. Dies dürfte dem Material des Gipfel II der P100-Säule entsprechen. (wird dieses Material von der P100-Säule getrennt gesammelt und über eine P2-Säule gegeben, erscheint es dann ausschließlich im Ausschlußvolumen.) Dieses Material, mit einem Molekulargewicht ≈ 2000 , das mit Hyaluronidase nicht abbaubar ist, dürften Glykopeptide (bestehend aus mindestens 10 Zuckern) aus Glykoproteinen sein.

Das von der P2-Säule eingeschlossene Material sind, im Vergleich zu der Eichung und der zu erwartenden Größe der Abbauprodukte, Okta- bzw. Septasaccharide, Tetra- bzw. Trisaccharide und Monosaccharide. Als Monosaccharid wurde die Glukuronsäure erwartet, die bei der Glukuronidase-Behandlung abgespalten wurde. Offensichtlich war die Abspaltung nicht vollständig, da nur 7% der Radioaktivität in diesem Gipfel erscheint (im Vergleich zu den möglichen 25%). Die Fraktionen von Gipfel I und IV wurden jeweils getrennt gesammelt, während die von Gipfel II und III zusammen gegeben wurden.

Das eingeengte Monosaccharid wurde in der Hochspannungselektrophorese aufgetrennt (Abb. 21). Etwa die Hälfte der Radioaktivität lief als saure Substanz zur Anode im Bereich der Glukuronsäure, jedoch etwas langsamer als die Referenzsubstanz. Der Rest blieb am Start liegen und sind vermut-

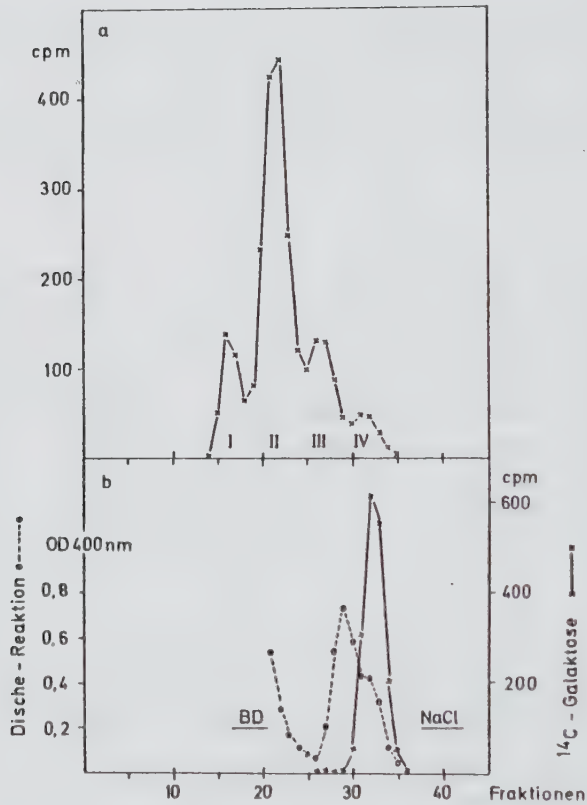


Abb. 20a Elutionsmuster des ^{14}C -markierten Kulturüberstandes nach Pronase-Behandlung, Dialyse, Hyaluronidase- und Glukuronidase-Behandlung über eine P2-Säule.
I: Glykopeptide
II: Okta- bzw. Septasaccharide
III: Tetra- bzw. Trisaccharide
IV: Monosaccharide

b Eichung der P2-Säule mit Dextranblau (BD), Maltotriose, ^{14}C -Galaktose und NaCl

lich Oligosaccharide aus Gipfel III. Glukuron- γ -laktone ist als Abspaltungsprodukt mit Glukuronidase nicht zu erwarten (105). Aus diesen Versuchen geht hervor, daß zumindest ein Teil der radioaktiven Markierung im Glykosaminoglykan als Glukuronsäure vorliegt.

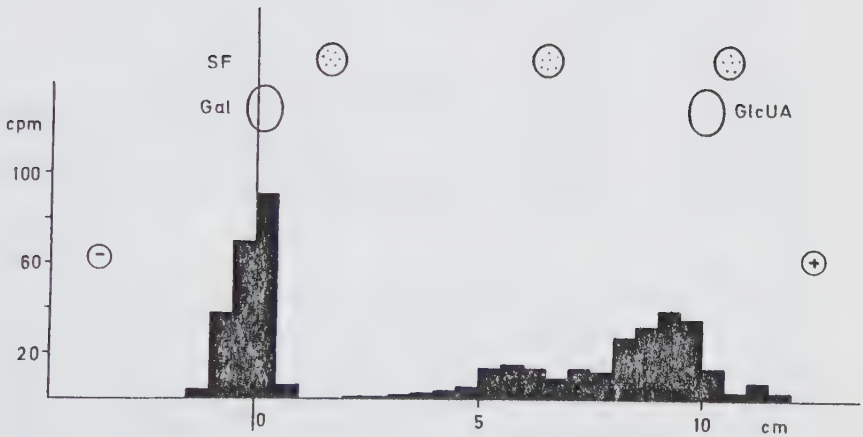


Abb. 21 Hochspannungselektropherogramm des eingeeengten Materials von Gipfel IV der P2-Säule (Abb. 20)

Die gesammelten Fraktionen von Gipfel I wurden eingeeengt und gemäß den Bedingungen für Oligosaccharide mit 1 N H_2SO_4 für 3 Stunden hydrolysiert und mit BaCO_3 neutralisiert (Probe I). Die eingeeengten Fraktionen von Gipfel II und III dagegen wurden mit 2 N HCl für 3 Stunden hydrolysiert und mit Ag_2CO_3 neutralisiert (Probe II). Beide Proben wurden in der Hochspannungselektrophorese laufen gelassen. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 dargestellt.

Probe I blieb als neutraler Fleck am Start liegen. Nach Elution des radioaktiven Neutralfleckens konnten weiter keine Aminosucker oder Glykuronsäure mit Trevelyan nachgewiesen werden. Die anschließende dünnschichtchromatographische Auftrennung des Neutralfleckens ergab folgendes Ergebnis (Abb. 23): Es konnten Fukose, Mannose, Glukose und Galaktose (im Vergleich zu den Referenzzuckern) mit Trevelyan angefärbt werden. Das dazugehörige Autoradiogramm jedoch wies nur einen radioaktiven Flecken an der Stelle der Galaktose auf. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, daß der Gipfel I der P2-Säule Glykopeptide aus Glykoprotein enthält, die durch ^{14}C -Galaktose markiert werden.

Probe II trennte sich in der Elektrophorese (Abb. 22) in zwei radioaktive Flecken auf: in einen Neutralfleck und einen sauren Fleck im Bereich der Glukuronsäure. Ein weiterer Fleck im Bereich der Aminosucker (Glukosamin) war nur mit Trevelyan-Reagenz nachweisbar. Der Neutralfleck (PII) und der saure Fleck (PIIa) wurden eluiert und dünnschichtchromatographisch laufen gelassen. Der Lauf von PII ergab drei schwach anfärbbare Flecken im Bereich der Fukose, Mannose und Glukose, doch dürften diese Verunreinigungen aus Gipfel I sein. Die Radioaktivität befand sich vorwiegend in einem nicht anfärbbaren Fleck in der Nähe des Starts und wurde nicht weiter identifiziert. Wahrschein-

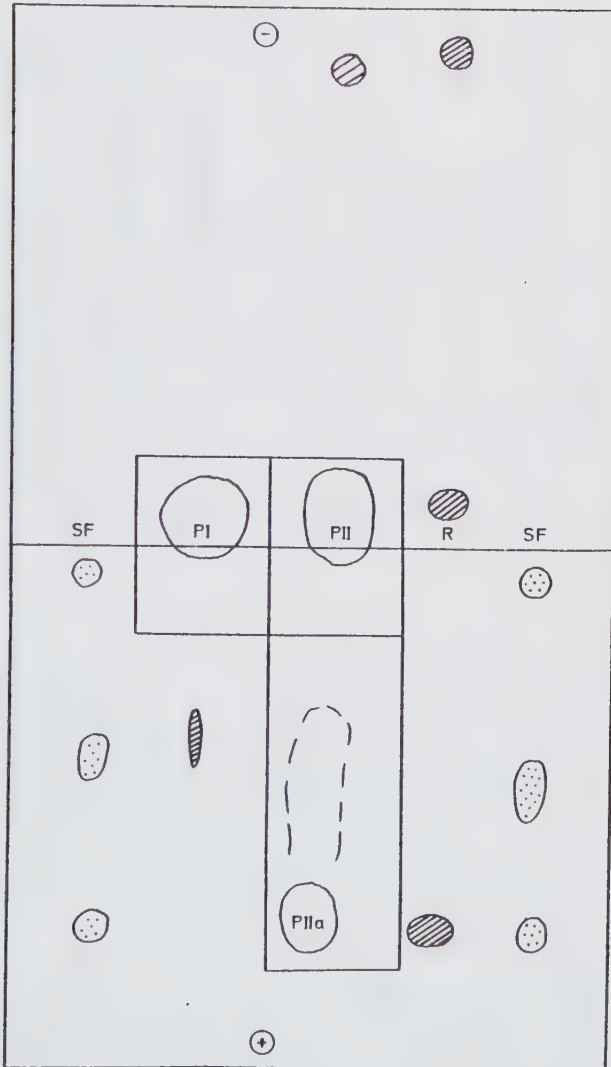


Abb. 22 Hochspannungselektropherogramm des mit ^{14}C -Galaktose markierten und hydrolysierten Kulturüberstandes nach Auftrennung über eine P2-Säule.
R: Galaktose- und Glukosamin-Gemisch
Erläuterung im Text.

lich handelt es sich um unvollständig hydrolysiertes Material. Der Lauf von PIIa ergab einen radioaktiven, schwach anfärbaren Flecken im Bereich der Glukuronsäure.

Sowohl durch Papier- wie durch Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Laufsystemen konnte gezeigt werden, daß die meiste radioaktive Markierung des Kulturüberstandes als Glukuronsäure vorliegt. Nach der getrennten Hydrolyse des Oligosaccharidteils der Glykoproteine und der Hyaluronidase-Abbauprodukte ist der Schluß zulässig, daß die Oligosaccharide direkt durch ^{14}C -Galaktose markiert werden, während bei den Hyaluronidase-sensitiven Glykosaminoglykanen die ^{14}C -Markierung der Galaktose in Glukuronsäure umgewandelt wurde. Radioaktive Aminosucker konnten im Kulturüberstand nicht nachgewiesen werden.

3.) Diskussion

Diese Untersuchung macht deutlich, daß ^{14}C -Galaktose eine geeignete radioaktive Vorstufe zur Markierung von Glykokonjugaten ist. Sowohl Glykopeptide wie Glykolipide werden bei der verwendeten Zellzahl ausreichend mit ^{14}C -Galaktose markiert, wobei nur ein geringer Teil in Glukose umgewandelt wurde. Andererseits erfolgte genügend Umwandlung der Galaktose in Glukuronsäure, um auch Glykosaminoglykane zu markieren (siehe Schema 2).

In Thymocyten ist ebenfalls beobachtet worden, daß etwa 30% der Galaktose umgewandelt wurde, zu meist in Glukose (106). Glukosamin wird zu 15% in Galaktosamin und N-Acetylneuraminsäure umgewandelt (63). Daß in den eigenen Versuchen keine radioaktiven Aminosucker nachweisbar sind, läßt vermuten, daß Galaktose nicht in weitere Stoffwechselwege geleitet wurde.

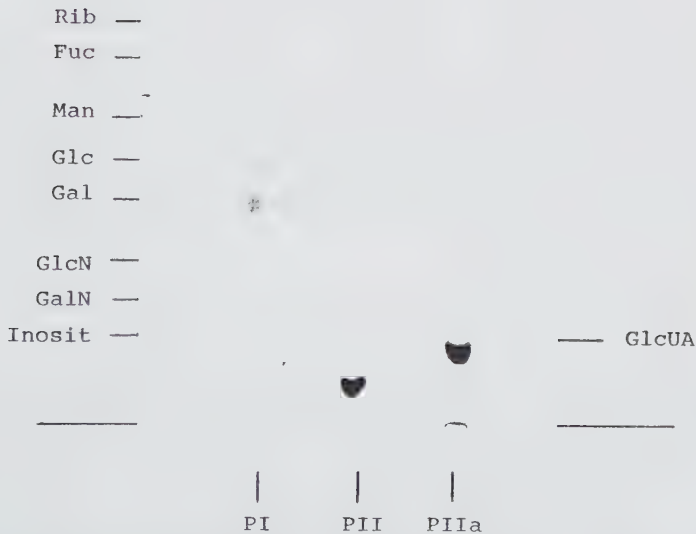
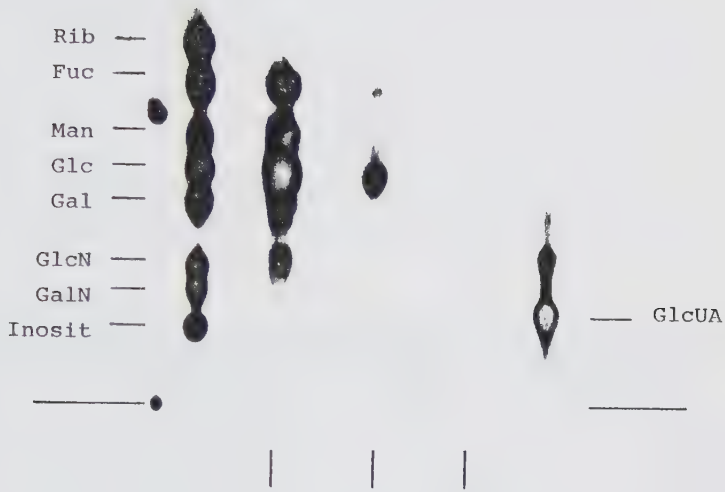


Abb. 23 Dünnschichtchromatogramm der radioaktiven Zuckerhydrolyzate aus Kulturüberstand. a.) Trevelyan-Anfärbung b.) Autoradiographie

Damit die angebotenen Zucker zu einem möglichst geringen Teil in andere Zucker umgewandelt und/oder metabolisiert werden, sollten folgende Bedingungen eingehalten werden (41):

- Die radioaktiven Zucker müssen in niedrigen Konzentrationen angeboten werden.
- Glukose muß im großen Überschuß vorhanden sein.
- Die Untersuchungszeit muß relativ kurz sein.

B. Verteilung der radioaktiven Markierung in verschiedene Glykokonjugatklassen von Zellen, Plasmamembran und Kulturüberstand

Wie schon bei den Versuchen zur Einbaukinetik während des Zellzyklus beschrieben, wird ^{14}C -Galaktose nicht nur in Glykoproteine, sondern auch in Glykolipide der Zelle inkorporiert. Zudem weist die Umwandlung von ^{14}C -Galaktose in ^{14}C -Glukuronsäure auf die Markierung von Glykosaminoglykanen hin. Um die Verteilung der Radioaktivität in die drei verschiedenen Glykokonjugatklassen zu verfolgen, wurden Zellmaterial, Plasmamembran und Kulturüberstand mit Pronase und Hyaluronidase behandelt und das Elutionsmuster der radioaktiven Substanzen auf einer P100-Säule vor und nach dem enzymatischen Abbau verglichen.

1.) Zellmaterial

Zunächst wurde dialysierte, sowohl mit ^{14}C -Galaktose als auch mit ^3H -Leucin markiertes (nicht doppelt markiertes) Zellmaterial von der Inkubationszeit 24-36 Stunden (Maximum) zusammen ohne Enzymbehandlung auf die P100-Säule gegeben. Die Zugabe von ^3H -Leucin markiertes Material diente dabei als interne Kontrolle, insbesondere für die folgenden Abbauversuche. Wie aus Abbildung 24 und Tabelle 3 (S.79)

ersichtlich ist, verteilt sich die inkorporierte Radioaktivität wie folgt:

- ^{14}C -Galaktose markiert das Ausschlußmaterial (Gipfel I) wie den darauffolgenden Gipfel II zu etwa gleichen Teilen.
- Die Markierung von ^3H -Leucin verteilt sich ebenfalls auf beide Gipfel, jedoch enthält Gipfel II nur 20% der Radioaktivität.

Nach der Pronase-Behandlung veränderte sich die Verteilung:

- Der Ausschlußgipfel enthält nur noch 17% der ^{14}C -Markierung, Gipfel II noch 39%. Etwa 40% des gesamten mit ^{14}C -Galaktose markierten Materials wird mit Pronase abgebaut.
- ^3H -Leucin markiert noch zu 12% das Ausschlußmaterial und zu 15% den Gipfel II. Insgesamt erschien 73% der Radioaktivität als niedermolekulares Material.

Da radioaktiv markierte Glykosaminoglykane, ins besondere Hyaluronsäure, im Zellmaterial zu vermuten waren, wurde verucht, diese mit Hyaluronidase abzubauen. Nach Pronase- und Hyaluronidase-Behandlung verteilte sich die Radioaktivität folgendermaßen:

- Nur 5% des Gipfel I war noch mit ^{14}C -Galaktose markiert, während Gipfel II unverändert blieb. Das abgebaute radioaktive Material ergab einen neuen niedermolekularen Gipfel.
- Die Verteilung der ^3H -Leucin Markierung veränderte sich unwesentlich.

Hyaluronidase-Behandlung ohne vorige Pronase-Behandlung ergab folgendes Elutionsmuster:

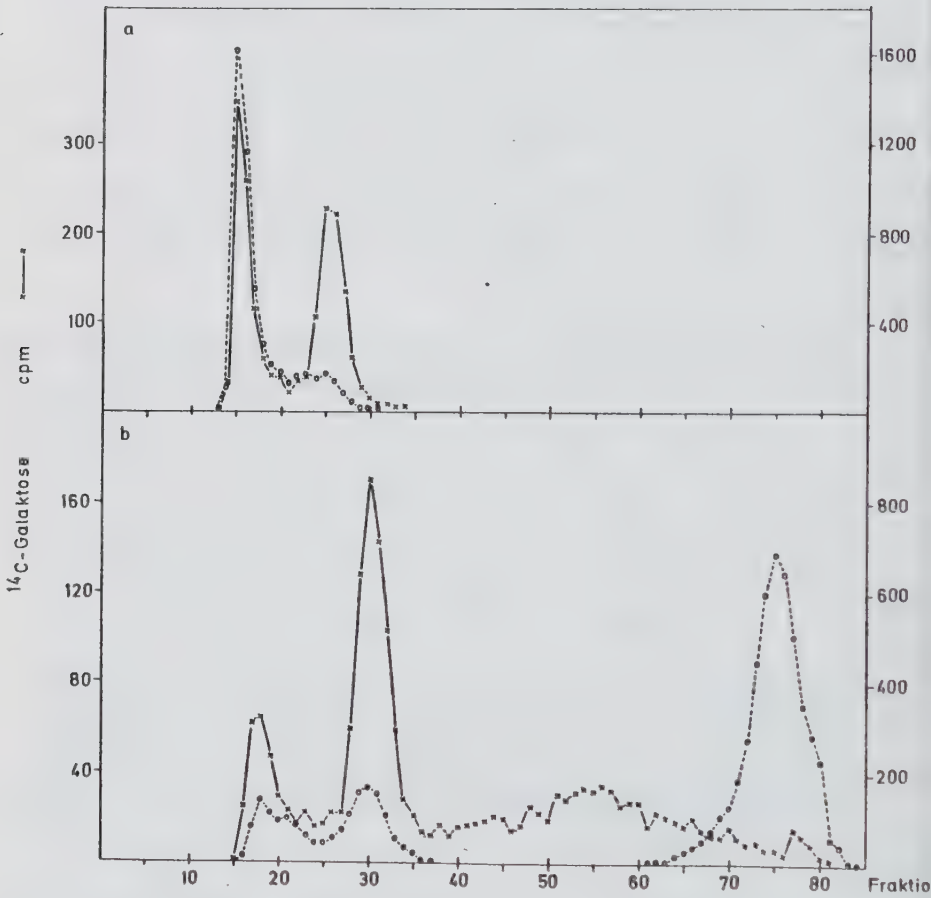


Abb. 24 Elutionsmuster über eine P100-Säule des mit ^{14}C -Galaktose und ^3H -Leucin markierten Zellmaterials
(a) ohne Enzym-Behandlung
(b) nach Pronase-Behandlung

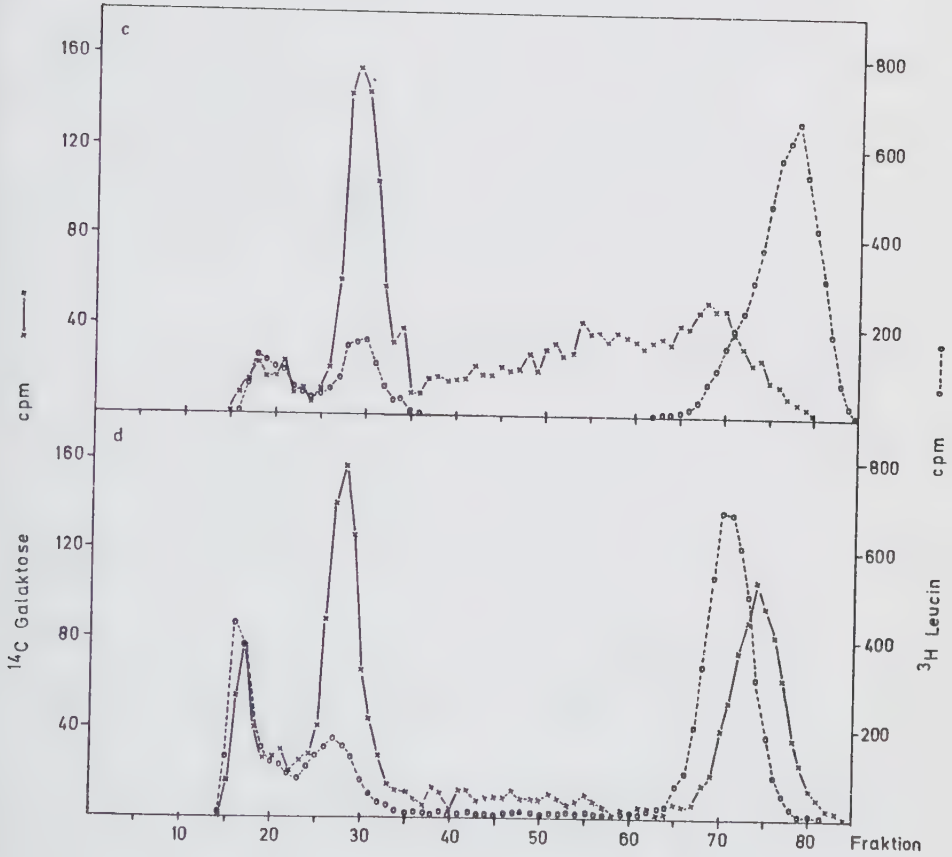


Abb. 24 (c) nach Pronase- und Hyaluronidase-Behandlung
(d) nach Hyaluronidase-Behandlung

- Etwa 15% der ^{14}C -Galaktose Markierung verblieb im Ausschlußmaterial, 38% in Gipfel II (gegenüber ursprünglich 46%. Die radioaktiv markierten Abbauprodukte wurden als niedermolekulares Material eluiert.
- Der Anteil an ^3H -Leucin-markiertem Material im Ausschlußgipfel wurde ebenfalls verringert (auf 23%), während Gipfel II kaum abgebaut wurde. Die ^3H -markierten Abbauprodukte scheinen ein höheres Molekulargewicht zu haben als die mit ^{14}C -Galaktose markierten.

Diese Ergebnisse weisen daraufhin, daß bei embryonalen Fibroblasten

- 1.) ^{14}C -Galaktose folgende Glykokonjugate markiert:
 - a.) Glykoprotein (Hyaluronidase-resistent)
 - b.) Glykosaminoglykane (Hyaluronidase-sensitiv)
 - c.) Glykolipide (Hyaluronidase- und Pronase-resistent)
- 2.) ^3H -Leucin
 - a.) wie erwartet in (Glyko-) Protein und in den Peptidteil von Glykosaminoglykanen eingebaut wird.
 - b.) auch in Pronase- und Hyaluronidase-resistentes Material eingebaut wird.

Behandlung	Fraktion	% cpm in					
		Gipfel I		Gipfel II		Rest	
		^{14}C	^3H	^{14}C	^3H	^{14}C	^3H
ohne Enzym	ganze Zellen	53.9	80.7	46.1	19.3	-	-
	Membran a)	73.6	54.4	26.4	40.0	-	-
	b)	66.7	63.4	33.3	36.6	-	-
	Kultur- überstand	100	100	-	-	-	-
Pronase	ganze Zellen	17.0	12.0	39.7	14.6	43.1	73.3
	Membran a)	42.4	-	20.9	-	36.5	100
	b)	23.6	-	33.5	-	42.8	100
	Kultur- überstand	28.0	1.1	-	-	53.0	94.2
Pronase und Hyaluronidase	ganze Zellen	6.3	9.7	36.9	13.0	56.7	77.2
	Kultur- überstand	4.1	8.3	4.4	9.3	91.5	82.4
Hyaluronidase	ganze Zellen	14.6	23.0	37.7	14.8	47.0	62.1
	Membran a)	57.1	46.7	28.5	40.8	14.3	12.4
	b)	55.5	48.5	37.8	39.9	6.6	11.5
	Kultur- überstand	30.9	63.8	8.8	7.2	60.0	27.7

Tabelle 3 Verteilung der Radioaktivität in verschiedene Fraktionen nach Enzymbehandlung und Elution über eine P100-Säule

2.) Plasmamembran

Daraufhin sollte die Verteilung der Radioaktivität in den Glykokonjugaten der Zellmembran untersucht und mit dem Zellmaterial verglichen werden. Dazu wurden Membranpräparationen nach zwei verschiedenen Markierungszeiten (beide Glykolipid-maxima) verwendet:

- a.) 24-30 Stunden
- b.) 48-54 Stunden

Die Elutionsmuster der beiden mit ^{14}C -Galaktose und ^3H -Leucin markierten Membranpräparationen sind in Abbildung 25 und 26 dargestellt. Sie zeigen, ähnlich wie für das gesamte Zellmaterial, zwei hochmolekulare Gipfel, jedoch im veränderten Verhältnis zu einander, (siehe auch Tabelle 3).

- Das Ausschlußmaterial enthält 74% (a.) bzw. 67% (b.) der ^{14}C -Markierung, während Gipfel II 26% bzw. 33% enthält.
- Die ^3H -Leucin Markierung verteilt sich zu 54% (a.) bzw. 63% (b.) auf den Ausschlußgipfel und zu 40% bzw. 37% auf einen hochmolekularen Gipfel II, der sich jedoch nicht deutlich vom ersten trennte.

Die Pronase-Behandlung veränderte dieses Elutionsmuster:

- Die ^{14}C -Markierung war nur noch zu 42% (a.) bzw. 24% (b.) im Ausschlußmaterial zu finden, d.h. es wurde zu 67% bzw. 36% abgebaut. Dagegen war der Anteil in Gipfel II fast unverändert.
- Der Anteil an ^3H -Markierung befand sich ausschließlich in einem niedermolekularen Gipfel.

Nach Hyaluronidase-Behandlung ergab sich folgende Verteilung der Radioaktivität:

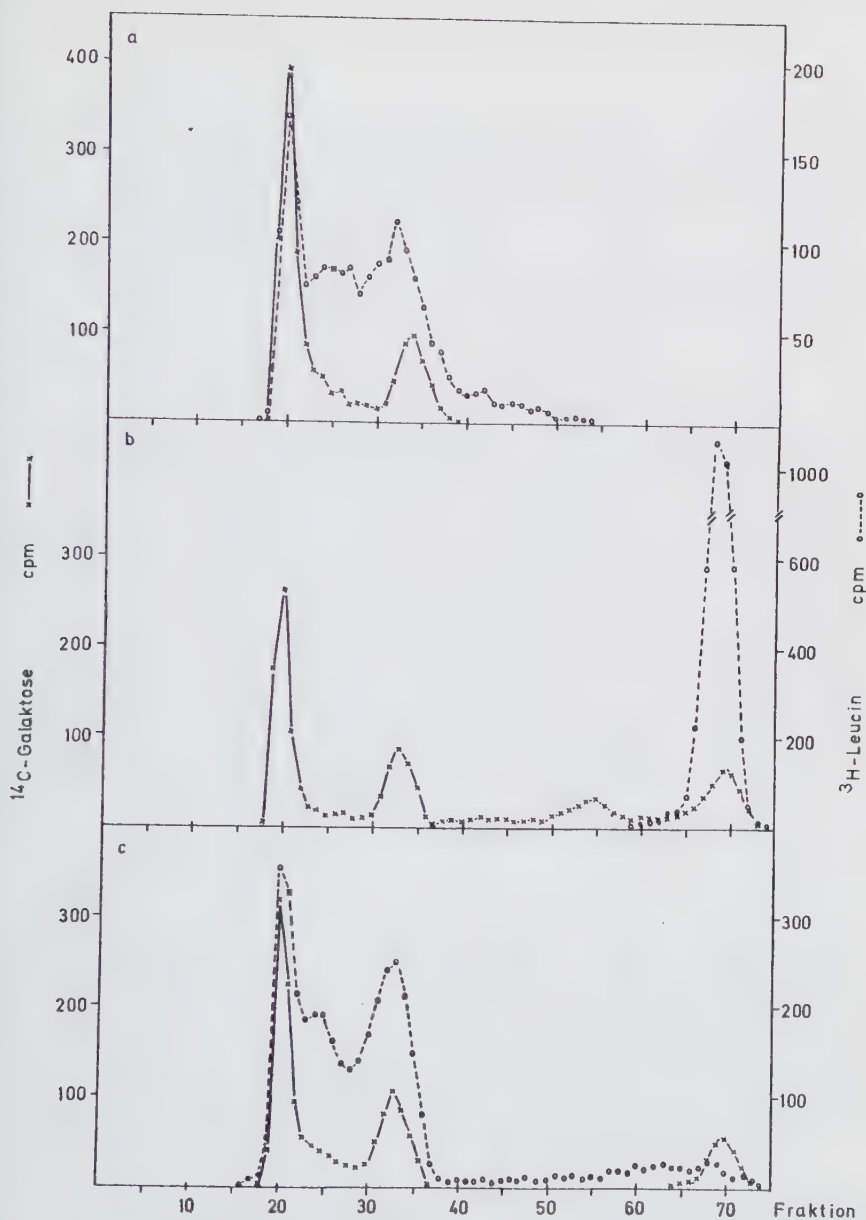


Abb. 25 Elutionsmuster über eine P100-Säule der mit ^{14}C -Galaktose und ^3H -Leucin markierten Plasmamembran, 24-30 Stunden

(a) ohne Enzym-Behandlung
 (b) nach Pronase-Behandlung
 (c) nach Hyaluronidase-Behandlung

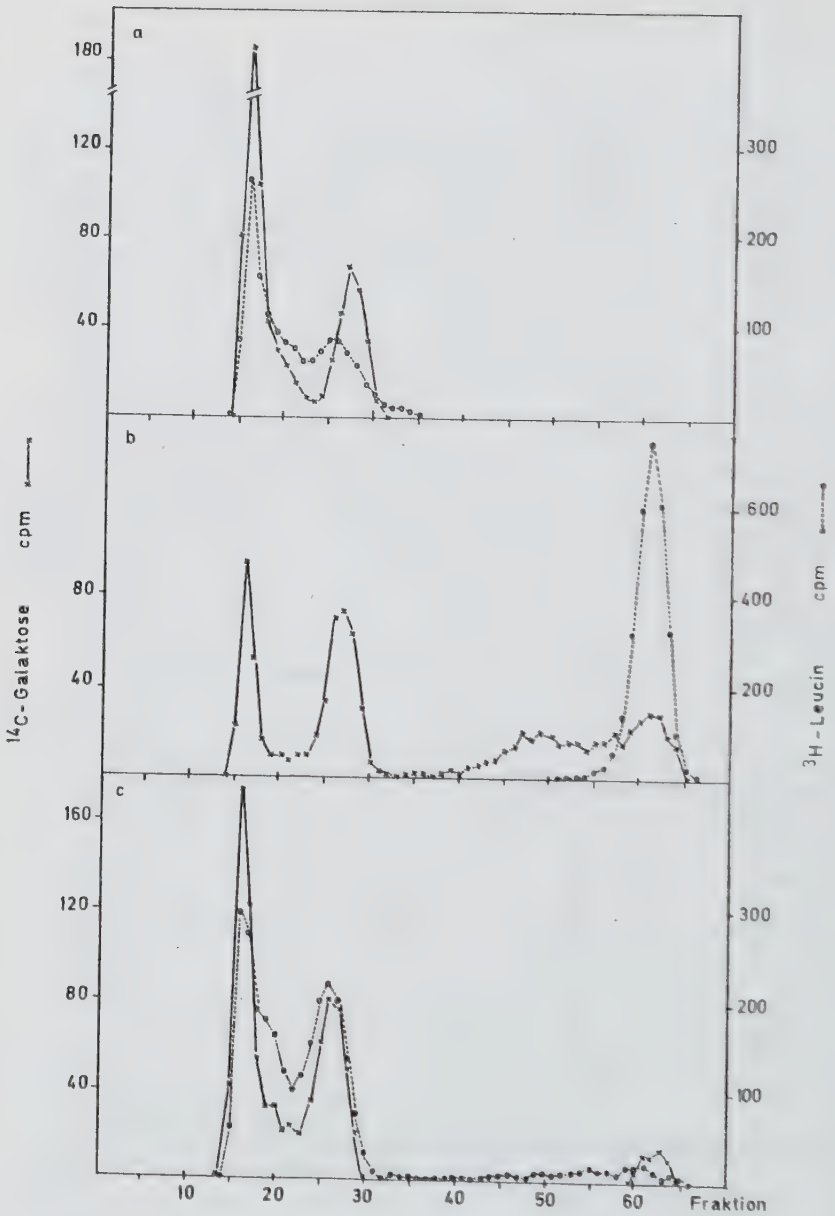


Abb. 26 Elutionsmuster über eine P100-Säule der mit ^{14}C -Galaktose und ^3H -Leucin markierten Plasmamembran, 48-54 Stunden
(a) ohne Enzym-Behandlung
(b) nach Pronase-Behandlung
(c) nach Hyaluronidase-Behandlung

- Von der ^{14}C -Markierung befand sich in beiden Präparationen etwa 56% im Ausschlußmaterial, d.h. nur etwa 22% bzw. 17% wurde abgebaut. Ein unveränderter Anteil war in Gipfel II.
- Die ^3H -Markierung befand sich zu 47% im Ausschlußmaterial, wobei auch hier der Anteil in Gipfel II unverändert blieb.

Die Unterschiede in der Radioaktivitätsverteilung zwischen den Membranpräparationen früh und später markierter Zellen sind nicht groß. Sie liegen hauptsächlich im Verhältnis zwischen dem Ausschlußmaterial (Glykoprotein und Glykosaminoglykan) und dem Gipfel II (Glykolipid). Die Membranen aus der früheren Markierungszeit enthalten mehr radioaktiv markiertes Glykosaminoglykan als die "späteren" Membranen. Letztere enthalten mehr Pronase- und Hyaluronidase-resistentes Material in Gipfel II. Im Gegensatz zum gesamten Zellmaterial wird keine Pronase- und Hyaluronidase-resistentes mit ^3H -Leucin markiertes Material in diesen Membranpräparationen gefunden.

3.) Kulturüberstand

Wie bei der Untersuchung des Zellmaterials, wurden die Kulturüberstände von mit ^{14}C -Galaktose und ^3H -Leucin markierten Fibroblasten aus der Markierungszeit von 24-36 Stunden verwendet. Das Elutionsmuster der Radioaktivität vom dialysierten Kulturüberstand unterscheidet sich auffallend von dem des gesamten Zellmaterials und der Plasmamembran (Abb. 27 und Tabelle 2).

- Sowohl für die ^{14}C - als auch die ^3H -Markierung befindet sich die gesamte Radioaktivität nur in dem Ausschlußmaterial.

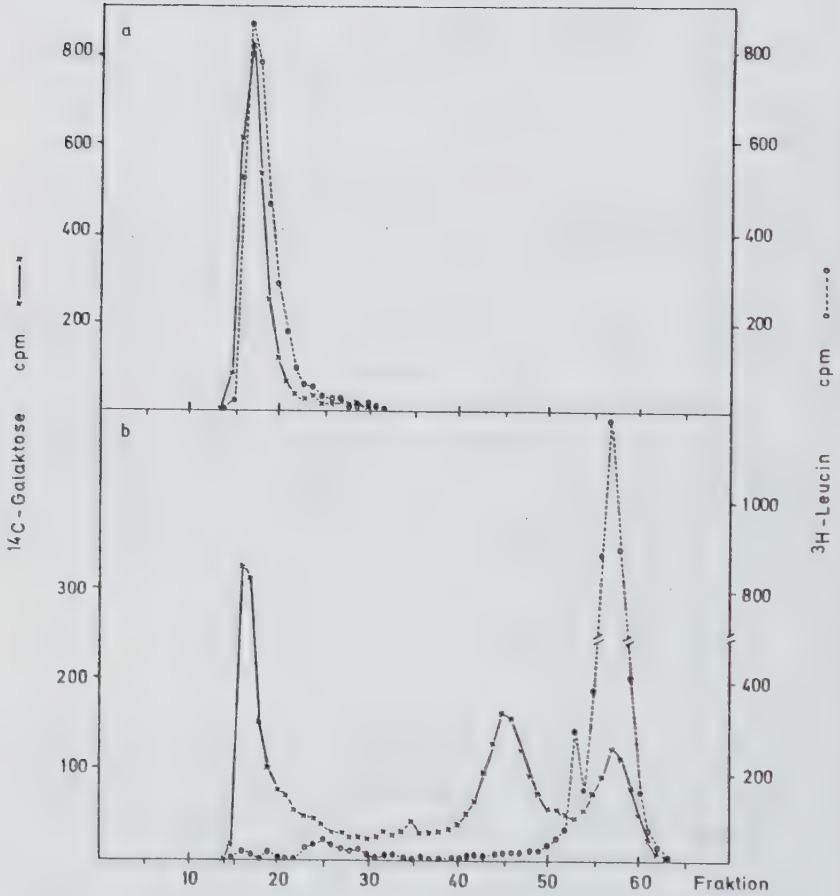


Abb. 27 Elutionsmuster über P100-Säule des mit ^{14}C -Galaktose und ^3H -Leucin markierten Kulturüberstandes
(a) ohne Ezymbehandlung
(b) nach Pronase-Behandlung

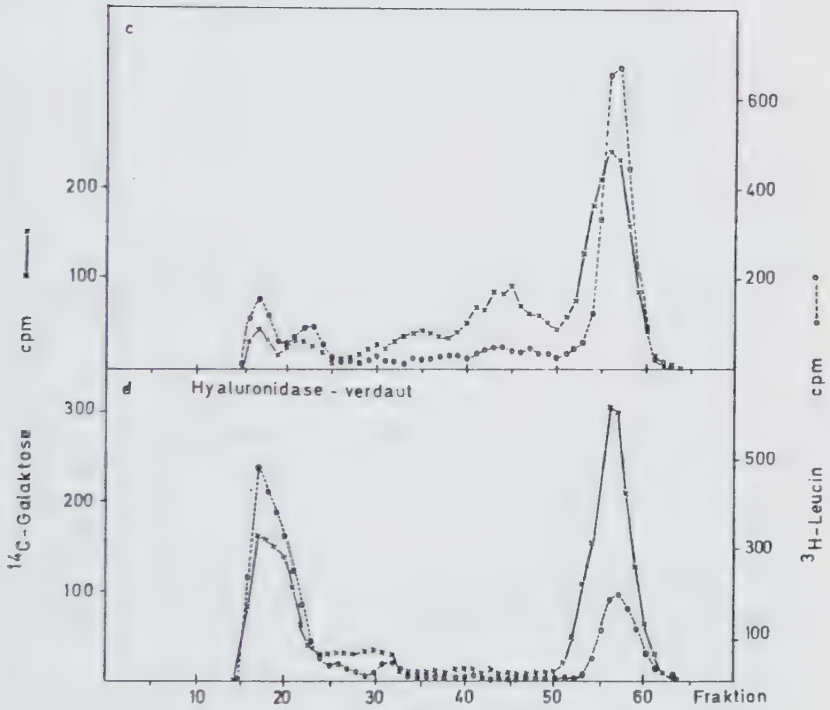


Abb. 27 (c) nach Pronase- und Hyaluronidase-Behandlung
(d) nach Hyaluronidase-Behandlung

Durch die Pronase-Behandlung wurde dieses Material weitgehend abgebaut:

- Nur noch 30-40% der ^{14}C -Markierung befindet sich im Ausschlußmaterial, während zwei Gipfel von niedrigem Molekulargewicht auftreten.
- Bei ausreichender Pronase-Zugabe kann ^3H -Leucin markiertes Material zu 100% aus dem Ausschlußmaterial abgebaut werden.

Da besonders im Kulturüberstand Glykosaminoglykane zu erwarten sind, lag es nahe, das hier anfallende Material mit Hyaluronidase zu behandeln. Nach Pronase- und Hyaluronidase-Behandlung war fast keine Radioaktivität im Ausschlußmaterial nachweisbar:

- Sowohl ^{14}C - wie ^3H -markiertes Material wurde bis auf wenige Prozent zu niedermolekularen Produkten abgebaut.

Hyaluronidase-Behandlung alleine vermochte nicht den gesamten Anteil der Radioaktivität aus dem Ausschlußmaterial zu entfernen:

- Je nach Aktivität des Enzyms betrug der Anteil der ^{14}C -Markierung im Ausschlußmaterial 10-30%.
- Dagegen war noch etwa 64% der ^3H -Markierung im dem hochmolekularen Ausschlußmaterial zu finden.

Aus den Ergebnissen ist zu schließen, daß ^{14}C -Galaktose von Fibroblasten in zwei Klassen von Glykokonjugaten, die ins Kulturmedium ausgeschieden werden, inkorporiert wird: in Glykoproteine und hauptsächlich Glykosaminoglykane. Der Abbau von ^3H -Markierung aus dem Ausschlußmaterial durch Hyaluronidase läßt auf einen Proteinanteil am Glykosaminoglykan schlies-

sen, wie bereits beschrieben (107). Einen Hinweis auf ^{14}C -markierte Glykolipide im Kulturüberstand gibt es nicht.

4.) Diskussion

Der enzymatische Abbau der radioaktiv markierten Glykokonjugate mit Pronase und Hyaluronidase und anschließender Auftrennung über eine P100-Säule bot sich als einfache und hinreichend spezifische Methode an, um die Verteilung der radioaktiven Markierung auf die verschiedenen Glykokonjugatklassen zu bestimmen. Ferner erlaubte diese Methode die Verteilung der Radioaktivität über die drei Glykokonjugatklassen im gesamten Zellmaterial, in der Plasmamembran und im Kulturüberstand zu vergleichen.

Dabei zeigte sich, daß in der Zelle wie in deren Plasmamembran Glykosaminoglykane, Glykoproteine und Glykolipide mit ^{14}C -Galaktose radioaktiv markiert werden. Der Kulturüberstand dagegen enthält nur Glykosaminoglykane und Glykoproteine, keine radioaktiv markierten Glykolipide. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, daß Glykoproteine und Glykosaminoglykane nicht durch Abgabe von Membranvesikel, sondern durch Sekretion in den Kulturüberstand gelangen.

Vergleicht man die Anteile der radioaktiv markierten Glykokonjugaten im Zellmaterial und in der Plasmamembran (nur oberen Seite der Zelle), so fällt auf, daß der Anteil an Glykolipiden in der Membran geringer ist als in der Zelle. Das kann durch eine Anreicherung der Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen erklärt werden. Jedoch kann das z.T. auch an der Präparation der Membranen liegen, wobei ein geringer Anteil der Lipiden herausgelöst werden kann (108). Andere Untersuchungen jedoch sprechen dafür, daß die Plasmamembran reich an Glykosaminoglykanen ist (88,89,109).

Ein quantitativer Vergleich von Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen ist nur bedingt möglich, da unvollständiger Abbau durch Hyaluronidase nicht ausgeschlossen werden kann, insbesondere bei den Membranpräparationen. Zudem könnten auch Glykosaminoglykane radioaktiv markiert worden sein, die nicht mit Hyaluronidase abbaubar sind.

C.) Untersuchung der Glykosaminolykane mittels Agarose-Gelelektrophorese

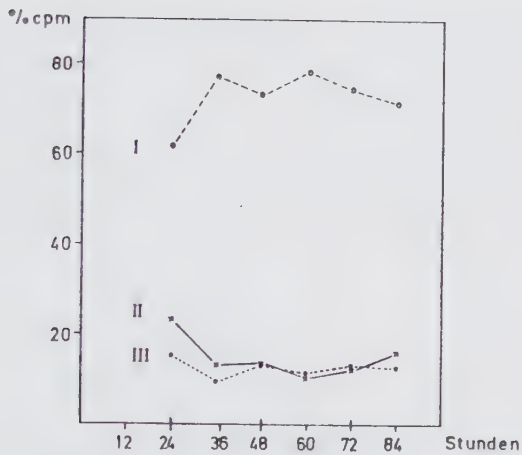
Daß Glykosaminoglykane Bestandteil sowohl der Zelle wie des Kulturüberstandes von kultivierten Fibroblasten sind, ist von mehreren Autoren beschrieben worden (88,89,94,107). Die eigenen Versuch stehen hiermit in Einklang. Jedoch erlaubten diese Abbauversuche keine nähere Klassifizierung der radioaktiv markierten Glykosaminoglykane, da testikuläre Hyaluronidase neben Hyaluronsäure auch Chondroitinsulfat (zum Teil auch Dermatansulfat (74)) abbaut. Zudem könnten auch Heparansulfat und Keratansulfat von der Zelle produziert werden (110).

Im Folgenden sollte mittels der Agarose-Gelelektrophorese (76) eine Klassifizierung der mit ^{14}C -Galaktose und $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markierten Glykosaminolykane von embryonalen Fibroblasten versucht werden.

1.) Zellmaterial

Fibroblasten wurden zu den verschiedenen Zeiten mit ^{14}C -Galaktose und $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markiert und dann mit Pronase abgebaut und dialysiert. Nach der Radioaktivitätszählung wurden von jeder Probe 10000 cpm entnommen, eingeengt und je zur Hälfte auf zwei Agarosegele aufgetragen. Die Proben auf den beiden Gelen wurden zusammen in der Elektrophorese aufgetrennt und

a.)



b.)

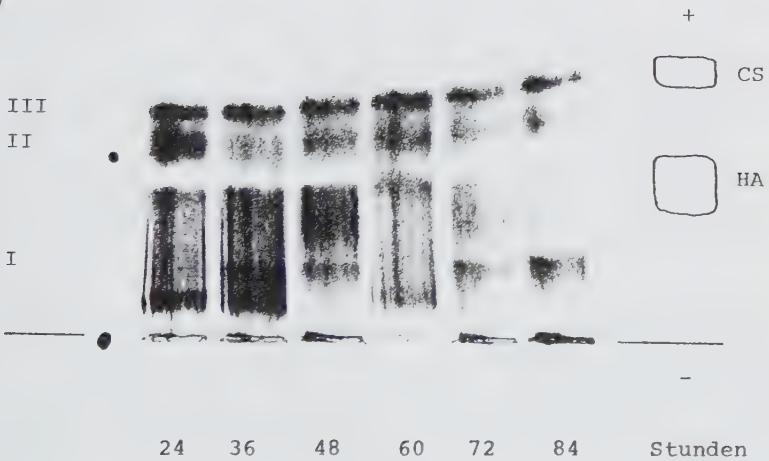
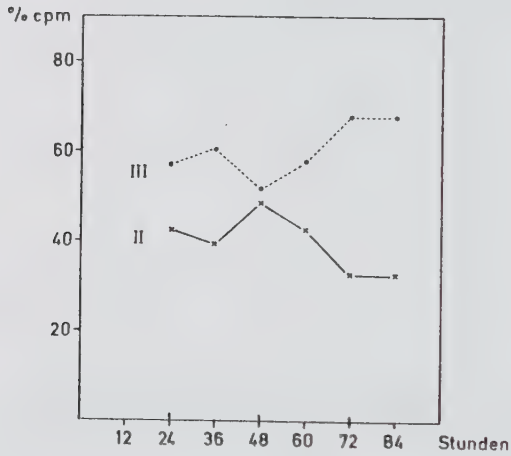


Abb. 28 Verteilung der ^{14}C -Markierung in zellulären Glykosaminoglykanen
a.) Anteil der Radioaktivität in den verschiedenen Flecken
b.) Autoradiogramm
CS: Chondroitinsulfat HA: Hyaluronsäure

a.)



b.)

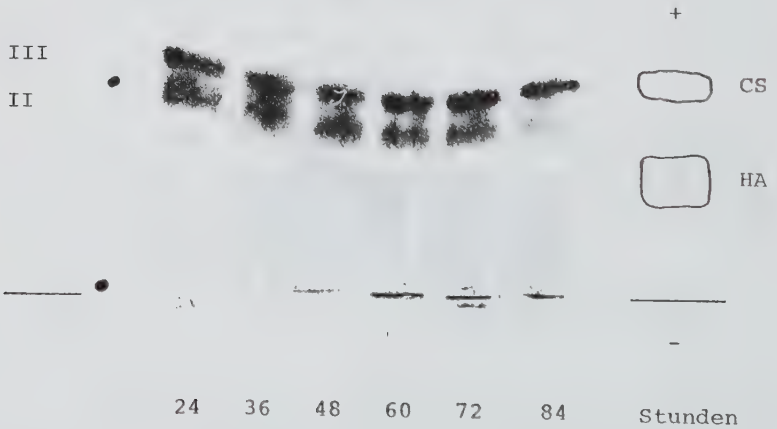


Abb. 29 Verteilung der $^{35}\text{SO}_4^{--}$ -Markierung in zellulären Glykosaminoglykanen
a.) Anteil der Radioaktivität in den beiden Flecken
b.) Autoradiogramm
CS: Chondroitinsulfat HA: Hyaluronsäure

in Cetavlon fixiert. Daraufhin wurde das eine Gel zur Radioaktivitätszählung in kleine Stücke zerschnitten, während das andere Gel für die Autoradiographie und Alcianblaufärbung getrocknet wurde. Die Autoradiogramme und die relative Verteilung der Radioaktivität zwischen den verschiedenen Flecken sind in Abbildung 28 und 29 dargestellt. Nur die Hälfte der aufgetragenen ^{14}C -Radioaktivität war nach dem Fixieren zu zählen.

Die ^{14}C -Galaktose und $^{35}\text{SO}_4^{--}$ -markierten Glykosaminoglykane zeigen auffallende Unterschiede im Muster: drei Flecke werden mit ^{14}C -Galaktose markiert, nur zwei mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$. Bisher ist nur eine nicht-sulfatierte Klasse von Glykosaminoglykanen bekannt: die der Hyaluronsäure. Die langsamste Substanz (I), die im Laufverhalten der Referenz-Hyaluronsäure gleicht und mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ nicht markiert wurde, dürfte Hyaluronsäure sein. Jedoch trat wiederholt ein starkes Verschmieren der Probe in diesem Bereich auf, das nicht erklärt werden konnte. Die Referenz-Hyaluronsäure zeigte ähnliches Verhalten. Es fiel auf, daß in diesem Bereich die Zellprobe deutliche radioaktive Banden aufwies, die langsamer als die Referenzsubstanz wandern. Diese Heterogenität der Hyaluronsäure kann durch Unterschiede in der Ladung und des Polymerisationsgrades erklärt werden. Zur besseren Charakterisierung dieser Substanz bedarf es weiterer Untersuchungen.

Die beiden schnelleren, sowohl mit ^{14}C -Galaktose als auch mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markierte Flecken laufen wie Referenz-Chondroitinsulfat. Andere sulfatierte Glykosaminoglykane, die in diesem System alle schneller als Hyaluronsäure laufen, sind nicht ausgeschlossen. Da jedoch nach Pronase- und Hyaluronidase-Behandlung das hochmolekulare, radioaktive Material fast vollständig abgebaut wurde, können diese beiden Flecken nicht als Heparansulfat oder Keratansulfat identifiziert werden,

da diese mit Hyaluronidase nicht abgebaut werden. Sehr wahrscheinlich sind daher sowohl der schnellere Fleck (III) wie der langsamere Fleck (II) zwei verschiedenen Klassen von Chondroitinsulfat zuzuordnen. Nach ihrem Laufverhalten könnte Fleck II Chondroitin-6-sulfat sein, Fleck III Chondroitin-4-sulfat, das wegen der höheren Sulfatierung schneller wandert.

Über die gesamte Markierungszeit gesehen, befindet sich der größte Anteil der ^{14}C -Markierung der zellulären Glykosaminoglykane mit durchschnittlich 73% in der Hyaluronsäure, während Fleck II und III etwa 15% und 12% der ^{14}C -Markierung enthält (Tabelle 4). Von der ^{35}S -Markierung befindet sich 40% in Fleck II, d.h. in dem vermutlichen Chondroitin-6-sulfat, und zu 60% in Fleck III, d.h. in dem vermutlichen Chondroitin-4-sulfat. Vergleicht man das Verhältnis der ^{35}S -Markierung zur ^{14}C -Markierung in Fleck II und III, so fällt auf, daß die Einbaurate umgekehrt proportional ist: so wird Fleck III im Vergleich zu Fleck II weniger mit ^{14}C -Galaktose markiert, jedoch mehr mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$. Man kann daraus schließen, daß die Substanz in Fleck III stärker sulfatiert ist.

Die Verteilung der Radioaktivität in den verschiedenen zellulären Glykosaminoglykanen veränderte sich während der Beobachtungszeit. Die Synthese von Hyaluronsäure im Vergleich zu den sulfatierten Glykosaminoglykanen zeigte einen deutlichen Anstieg in der S-Phase. Der Grad der Sulfatierung zeigte ebenfalls deutliche Schwankungen, am deutlichsten zwischen 48 und 72 Stunden, wo Fleck III zunehmend stärker mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markiert wird. In Abbildung 30 ist zu ersehen, daß der Anteil der ^{14}C -Markierung und ^{35}S -Markierung in Fleck III (wie auch II) sich gegenläufig veränderte.

Fleck	Zellmaterial			Kulturüberstand		
	% cpm		$^{35}\text{S}/^{14}\text{C}$	% cpm		$^{35}\text{S}/^{14}\text{C}$
	^{14}C	^{35}S		^{14}C	^{35}S	
I	73,0	-	-	78,0	-	-
II	14,7	39,6	2,7	6,5	14,7	2,3
III	12,3	60,3	4,9	15,4	85,2	5,5

Tabelle 4: Verteilung der Radioaktivität in Glykosaminoglykanen nach Auftrennung in Agarose-Gelelektrophorese. Erläuterung im Text.

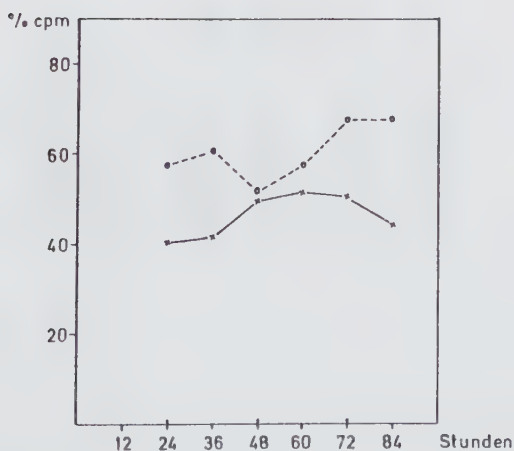


Abb. 30 Vergleich der Markierung des Flecken III der zellulären Glykosaminoglykane mit ^{14}C -Galaktose (*—*) und $^{35}\text{SO}_4^{--}$ (o-----o).

2.) Kulturüberstand

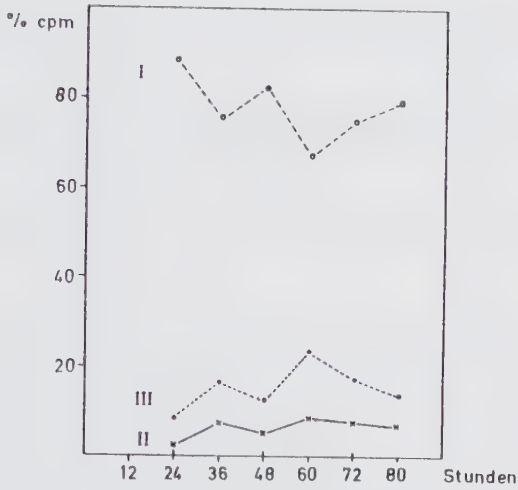
Der mit ^{14}C -Galaktose und $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markierte Kulturüberstand der Fibroblastenkulturen wurde ebenfalls mit Pronase abgebaut und dialysiert. Die Auftragung der radioaktiven Proben und die Bereitung der Gele wurde wie schon für das Zellmaterial beschrieben durchgeführt. In Abbildung 31 und 32 sind die Ergebnisse dargestellt.

Die Anfärbung des Gels entsprach der Autoradiographie der ^{14}C -Markierung bis auf das Fehlen des Flecken II in der Anfärbung. Das Muster der ^{14}C - und ^{35}S -Markierung der Glykosaminoglykane des Kulturüberstandes glich im Wesentlichen dem der Zelle. Jedoch hatte sich die Radioaktivitätsverteilung geändert. In der Hyaluronsäure befindet sich bis 78% der ^{14}C -Markierung, in Fleck III etwa 15%, und nur 6,5% in Fleck II. Während die Flecken II und II als deutliche Banden laufen, war das Material im Bereich der Hyaluronsäure verschmiert.

Mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ waren wiederum nur Flecken II und III markiert, wobei sich 85% der Radioaktivität in Fleck II befand. Auch hier wurde Fleck III im Vergleich zur ^{14}C -Markierung doppelt soviel mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markiert als Fleck II (Tabelle 4).

Auffallend ist, daß während die Markierung verschiedener Glykosaminoglykane mit ^{14}C -Galaktose deutlich schwankte, die Markierung mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ in der gleichen Zeit keinerlei Veränderungen zeigte. Wie schon für die zellulären Glykosaminoglykane erwähnt, änderte sich die Verteilung der Radioaktivität während der Beobachtungszeit. Eine Abhängigkeit vom Zellzyklus ist daraus nicht unbedingt zu schließen. Für die Markierung mit ^{14}C -Galaktose zumal gilt, daß in mehreren Versuchen unterschiedliche Schwankungen auftraten, jedoch mit der generellen Tendenz, daß der Anteil der Hyalu-

a.)

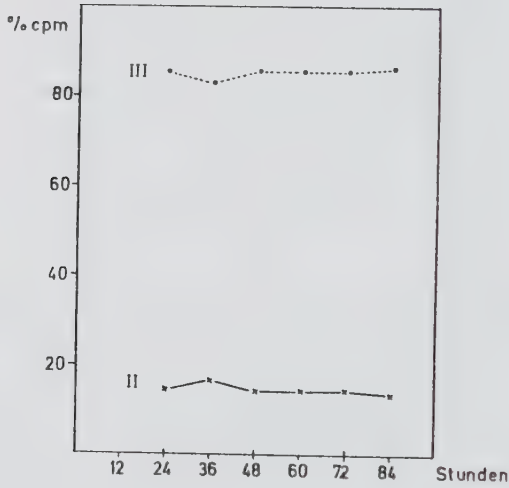


b.)



Abb. 31 Verteilung der ^{14}C -Markierung in Glykosaminoglykanen des Kulturüberstandes
a.) Anteil der Radioaktivität in den verschiedenen Flecken
b.) Autoradiogramm

a.)



b.)



Abb. 32 Verteilung der $^{35}\text{SO}_4$ -Markierung in Glykosaminoglykanen im Kulturüberstand
a.) Anteil der Radioaktivität in den verschiedenen Flecken
b.) Autoradiogramm
CS: Chondroitinsulfat HA: Hyaluronsäure

ronsäure im Kulturüberstand zum Ende der Kultivationszeit abnahm.

3.) Zusammenfassung der Ergebnisse über die radioaktive Markierung von Glykosaminoglykanen

Wie diese Untersuchung gezeigt hat, gibt es deutliche Unterschiede

- im Muster der mit ^{14}C -Galaktose und der mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markierten Glykosaminoglykanen
- im Muster zwischen zellulären und ins Kulturmedium abgegebenen Glykosaminoglykanen

In Abbildung 33 sind die Ergebnisse der Einbaukinetik der gesamten Glykosaminoglykane (Abb. 13,15) mit der relativen Verteilung der radioaktiven Markierung auf die verschiedenen Klassen (Abb. 28,29,31,32) zusammengefaßt. Daraus wird besonders ersichtlich, daß Hyaluronsäure (I) das dominierende Glykosaminoglykan ist, daß zudem die größten quantitativen Veränderungen während der Kultivationszeit zeigt. Die Synthese der sulfatierten Glykosaminoglykane dagegen zeigt nur geringe Schwankungen in dieser Zeit.

4.) Diskussion

Glykosaminoglykane können auf Grund ihrer unterschiedlichen sauren Ladungen in der Agarose-Gelelektrophorese getrennt werden. Hierbei kann der Einfluß unterschiedlicher Molekulargewichte nicht ausgeschlossen werden. Obwohl nur eine chemische Analyse die verschiedenen Klassen schlüssig identifizieren kann, so erlaubte diese Methode zusammen mit den zwei radioaktiven Markierungen eine vorläufige Charakterisierung. Ferner ermöglichte sie, die Verteilung der Glykosaminoglykane im Zellmaterial und im Kulturüberstand während des Zellzyklus zu vergleichen.

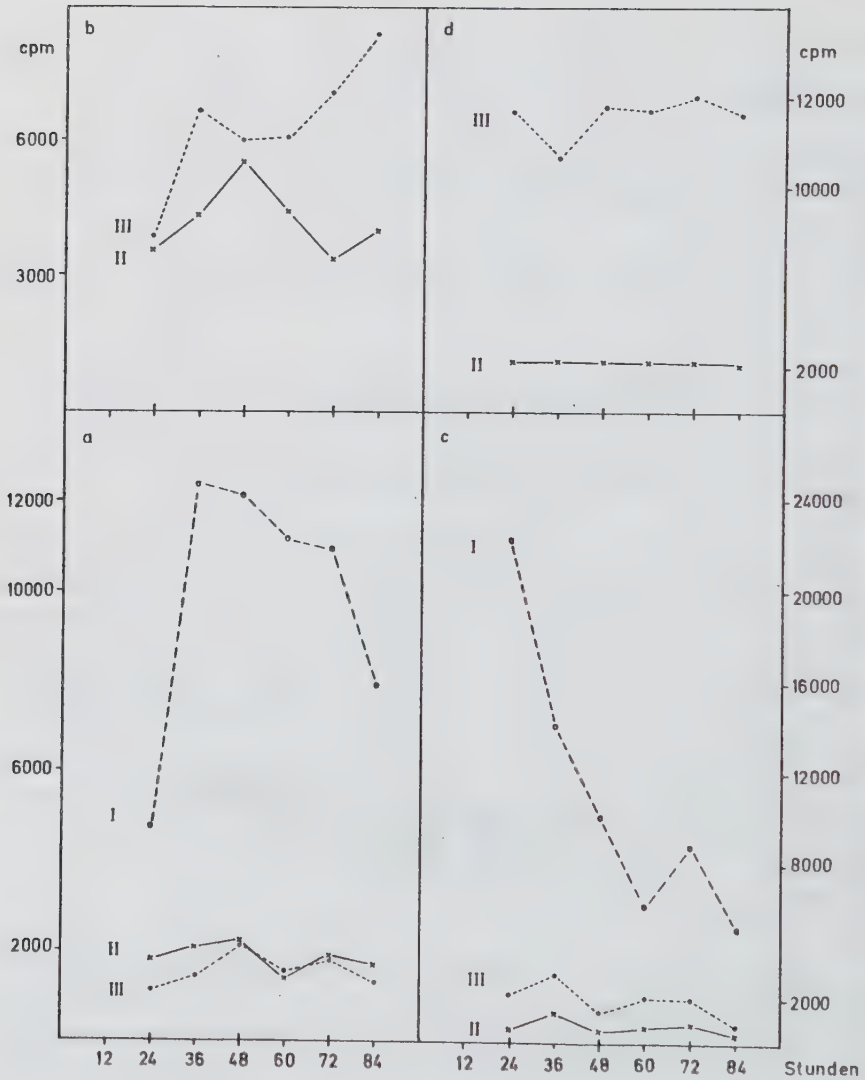


Abb. 33 Synthese von Glykosaminoglykanen und deren Abgabe ins Kulturmedium während des Zellzyklus
 (a) ^{14}C -Galaktose in zelluläre Glykosaminoglykane
 (b) $^{35}\text{SO}_4^{--}$ in zelluläre Glykosaminoglykane
 (c) ^{14}C -Galaktose in Glykosaminoglykane im Kulturmedium
 (d) $^{35}\text{SO}_4^{--}$ in Glykosaminoglykane im Kulturmedium

Wie aus Abbildung 33 ersichtlich, scheint die Sulfatierung der Glykosaminoglykane nicht unmittelbar mit der Synthese des Grundgerüsts gekoppelt zu sein. Das hätte zur Folge, daß sich der Grad der Sulfatierung einer Glykosaminoglykan-klasse ändert. Dies gilt insbesondere für die zellulären Glykosaminoglykane. Weiterhin fällt auf, daß in der Zelle und in das Kulturmedium abgegebene Glykosaminoglykanklassen (II und III) sich in ihrem Sulfatierungsgrad unterscheiden. Für humane Fibroblasten wurde gefunden, daß Galaktosaminoglykane in der Zelle höher sulfatiert sind als im Medium (94).

Eine Abhängigkeit der radioaktiven Markierung der Glykosaminoglykane vom Zellzyklus ist nicht eindeutig, da der Einfluß von Kulturbedingungen, wie erhöhte Zelldichte und durch die Kultivation verändertes Medium, nicht ausgeschlossen werden kann. Bei 3T3-Fibroblasten nahm mit höherer Zelldichte die radioaktive Markierung von Hyaluronsäure ab (109,111).

Die durchschnittliche Verteilung der Markierung mit ^{14}C -Galaktose zwischen den drei Glykosaminoglykanklassen entspricht der in anderen Arbeiten (109,112). Ein Vergleich dieser Daten gibt Tabelle 5. Obwohl verschiedene radioaktive Vorstufen bei den 3T3-Fibroblasten verwendet wurden, ist der Anteil der Radioaktivität in der Hyaluronsäure im Zellmaterial wie im Kulturmedium gleich.

Wiederholt wurde beschrieben, daß Heparansulfat in verschiedenen Fibroblastenkulturen Bestandteile der Zelle und des Kulturmediums sind (89,104,110). In eigenen Versuchen hätte dieses Glykosaminoglykan z.T. in der Glukuronsäure radioaktiv markiert werden können. Die Abbauprobe mit Hyaluronidase (und anschließende Agarose-Gelelektrophorese) ergab jedoch keine Hinweise auf nicht abbaubares Heparansulfat. Sie deuteten vielmehr darauf hin, daß die sulfatierten Substanzen Chondroitinsulfate sind. Jedoch kann

Glykosaminoglykan- klasse	radioaktive Markierung	% cpm	
		Zelle	Kulturüberstan
Hyaluronsäure	^3H -Glukose (1)	70,4	77,4
	^3H -Acetat (2)	66,6	81,4
	^{14}C -Galaktose (3)	73,4	78,0
Heparansulfat	^3H -Glukose	11,6	1,9
	^3H -Acetat	11,5	2,4
Chondroitinsulfat	^3H -Glukose	18,1	20,8
	^3H -Acetat	22,0	16,0
	^{14}C -Galaktose	27,0	21,9

Tabelle 5: Vergleich des Einbaus verschiedener radioaktiver Vorstufen in Glykosaminoglykane

(1) in 3T3 Fibroblasten, Cohn et al. (109)

(2) in 3T3 Fibroblasten, Hopwood u. Dorfman (112)

(3) in embryonale Fibroblasten, eigene Arbeit

dies nur eine vorläufige Identifizierung sein, da Heterogenität in der Grundstruktur und Änderungen in der Sulfatierung die Merkmale einer Glykosaminoglykanklasse verändert (106).

D. Untersuchung der Glykolipide mittels Dünnschichtchromatographie

Aus Vorversuchen (dünnschichtchromatographische Auftrennung von Gipfel II der P100-Säule, Abb.24) war bekannt, daß ^{14}C -Galaktose auch Glykolipide markierte. Zudem zeigte die Inkorporation von ^{14}C -Galaktose in Glykolipide Zellzyklus-abhängige quantitative Unterschiede. Es sollte nun untersucht werden, ob es auch qualitative Unterschiede gibt, d.h. ob sich daß Muster der radioaktiv markierten Glykolipide veränderte.

Die Glykolipide wurden nach zwei verschiedenen Methoden in Neutralglykolipide und Ganglioside getrennt und weiter isoliert (siehe Methoden). Beide Methoden ergaben nach der Auftrennung in der Dünnschichtchromatographie das gleiche Muster. Die dargestellten Autoradiogramme sind Muster von Glykolipiden, die nach der zweiten Methode (DEAE-Sephadex, Acetylierung, Verteilung nach Carter und Kanfer) gewonnen wurden.

1.) Neutralglykolipide

Das in Abbildung 34 dargestellte Autoradiogramm läßt vier Doppelbanden erkennen. (Die Doppelbanden werden auf unterschiedliche Fettsäuren im Ceramidteil zurückgeführt). Im Vergleich zu dem Referenzgemisch aus Maushirn-Neutralglykolipiden und Globosid konnte eine vorläufige Kennzeichnung der radioaktiv markierten Banden getroffen werden. Auffallend ist die starke, gleichmäßige radioaktive Markierung der Doppelbande I, die Monhexosylceramiden entspricht. Di- und Trihexosylceramide werden deutlich schwächer markiert. Da Ceramide mit mehreren Zuckern durch ^{14}C -Galaktose stärker radioaktiv markiert werden sollten, weist die starke Markierung des Monhexosylceramid auf dessen bevorzugte Syn-

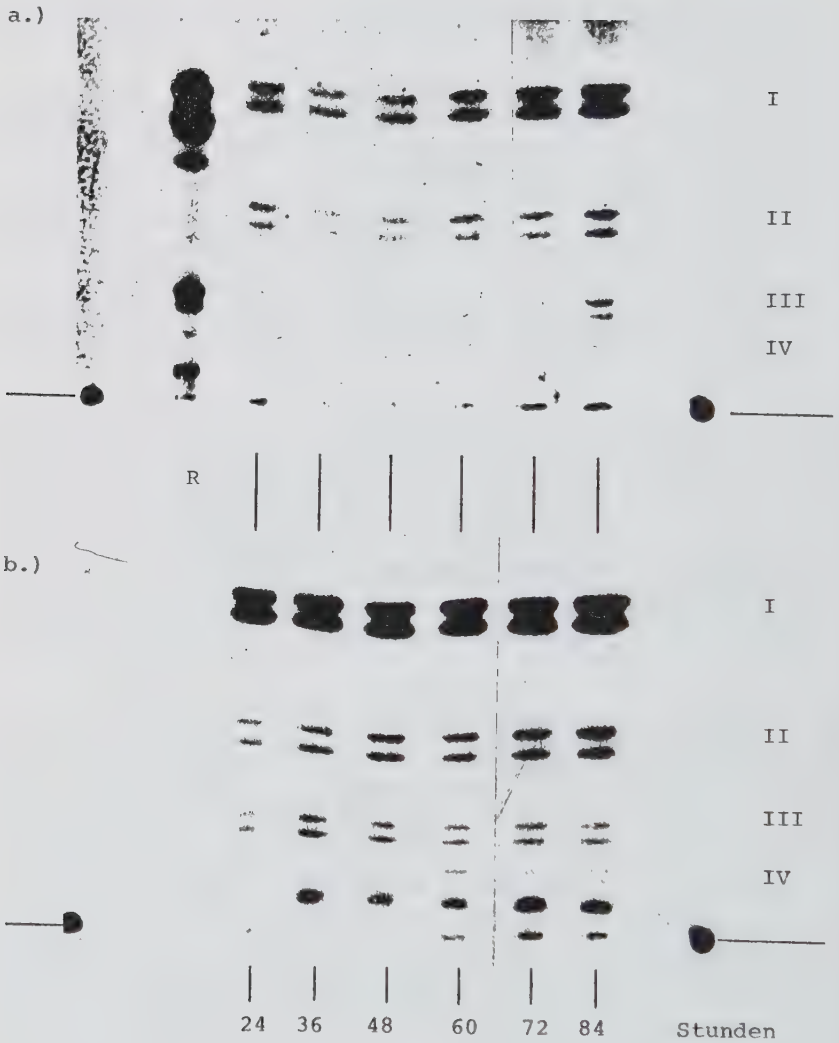


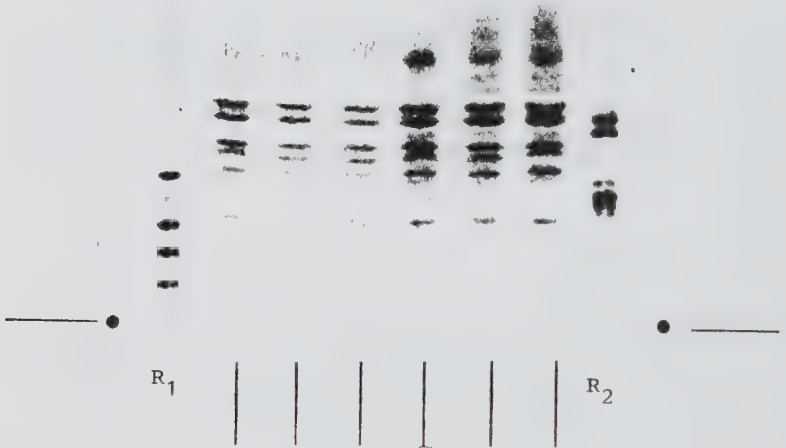
Abb. 34 Neutralglykolipidmuster während des Zellzyklus
a.) Orcinanfärbung R: Mausgehirn-Neutralglykolipid
b.) Autoradiogramm

these hin, und zwar zu allen Zeiten des Zellzyklus. Am schwächsten wurde Doppelbande IV (Tetrahexosylceramid) markiert, d.h. es dürfte nur in sehr geringen Mengen synthetisiert werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß in embryonalen Mäusefibroblasten während des Zellzyklus das gesamte Muster an Neutralglykolipiden gleichbleibt, wobei hauptsächlich kurzkettige Neutralglykolipide synthetisiert werden.

2.) Ganglioside

Das Autoradiogramm der Ganglioside (Abb. 35) zeigt eine Anzahl von Doppel- und auch Einzelbanden. Dabei enthält die schnellste Doppelbande kein Gangliosid, da diese nicht die für Ganglioside typische Rsorcinfärbung annimmt. Diese Doppelbande wurde nicht näher identifiziert. Die übrigen Banden wurden mit den Referenzgemischen aus Gangliosiden von menschlichem Gehirn, von Kalbsthymus und von Mäusegehirn verglichen. Die obersten drei radioaktiven Gangliosidbänden, wovon die dritte nur schwach markiert wurde, dürften zu den Hämatosiden, den einfachsten Gangliosiden mit nur einer Neuraminsäure, gehören. Die langsameren zwei Doppelbanden sind wahrscheinlich Ganglioside mit zwei oder drei Neuraminsäuren oder aber mit einer längeren Neutralzucker- und Aminozuckerkette. Eine genauere Kennzeichnung bedarf weiterer Untersuchungen. Es fällt auf, daß die erste Bande der Doppelbanden stärker radioaktiv markiert wurde als die zweite. Längerkettige Ganglioside, wie sie im Mäusehirn vorkommen (d.h. größer als Sialyltetrahexosylceramide), werden in embryonalen Mäusefibroblasten kaum markiert. Zellzyklus-abhängige Unterschiede im Muster der Ganglioside konnten nicht beobachtet werden.

a.)



b.)

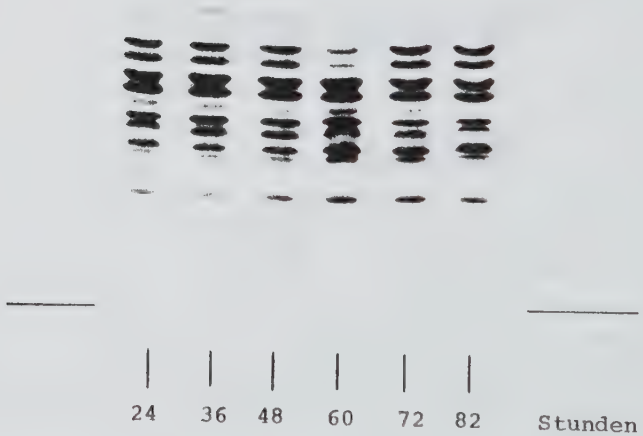


Abb. 35 Gangliosidmuster während des Zellzyklus
a.) Resorcinanfärbung R₁: menschliche Gehirnganglioside R₂: Kalbsthymusganglioside
b.) Autoradiogramm

3.) Diskussion

Diese Ergebnisse haben gezeigt, daß ein komplexes Muster an Neutralglykolipiden und Gangliosiden in embryonalen Mäuse-fibroblasten durch ^{14}C -Galaktose markiert werden. Insgesamt wurden in diesem System 16 Glykolipide in der Autoradiographie nachgewiesen. Die Muster sind spezifisch für den Zelltyp, sowohl bezüglich der Spezies als auch dem Gewebe, aus dem er stammt (59). Es gibt auch Unterschiede zwischen Zell-Linien und ihrem parentalen Zelltyp (113).

Die eigenen Untersuchungen wurden mit ganzen Zellen durchgeführt, womit sich die Frage stellt, in wie weit die Glykolipidmuster für die Plasmamembran gelten. In einem Vergleich des Glykolipidmusters von 3T3-Zellen mit deren Plasmamembran zeigte sich, daß im Gangliosidmuster nur geringe quantitative Unterschiede festzustellen sind und die Muster der Neutralglykolipide identisch sind (114). Damit übereinstimmend sind Resultate von Milchdrüsenzellen der Kuh, wo das gesamte Gangliosidmuster in allen Fraktionen (u.a. Plasmamembran, Golgi-Apparat, Kernmembran) vorkommt. Der größte Anteil an Gangliosiden befand sich jedoch in der Plasmamembran (115). Das Glykolipidmuster der ganzen Zellen kann als repräsentativ für die Plasmamembran betrachtet werden.

In einem Vergleich der Glykolipidmuster von einer humanen Krebszell-Linie, die sowohl als Zellrasen wie auch in Suspension wächst, wurde festgestellt, daß, obwohl die Zellen in beiden Wachstumsformen das vollständige Muster enthalten, sie in Suspension in den einfacheren Glykolipiden angereichert sind (116). Ein Glykolipidmuster ist kein konstanter Bestandteil eines Zelltyps, sondern ändert sich mit Faktoren, die das Wachstum der Zelle verändern. Änderungen sowohl in der Synthese wie Expression einzelner Glykolipide

treten besonders bei der Transformation (chemische wie Virus-induzierte) der Zelle auf (117,118).

Um auf die Fragestellung des Glykolipidmuster der embryonalen Fibroblasten während des Zellzyklus einzugehen, muß anhand der eigenen Versuche geschlossen werden, daß das gesamte Muster an Neutralglykolipide wie Ganglioside zu allen Zeiten synthetisiert werden. Quantitative Unterschiede einzelner Komponenten konnte autoradiographisch nicht nachgewiesen werden. Während Gahmberg und Hakomori (119) in NIL-Zellen ebenfalls keine Unterschiede im Muster der Neutralglykolipide während des Zellzyklus finden, berichten Hirschberg et al. für ähnliche Zellen, daß Trihexosyl- und Tetrahexosylceramide nur während der G₁- und S-Phasen radioaktiv markiert werden (120).

ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Glykokonjugate als Bestandteile der Plasmamembran werden seit längerem in Verbindung zur Wachstumskontrolle und zur Regulation des Zellzyklus gebracht. Sowohl Glykolipide (59) wie Glykoproteine (60,61) und Glykosaminoglykane (41) zeigen Schwankungen in ihrer Synthese und Expression auf der Zelloberfläche während des Zellzyklus und mit veränderten Wachstumsbedingungen. Die Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen an Zell-Linien, die aufgrund ihrer karyotypischen und phänotypischen Abweichungen von ihrer Ursprungszelle als Modellsystem nur bedingt geeignet erscheinen. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, Zellzyklus-abhängige Änderungen in der Glykokonjugatsynthese in einem Zelltyp zu untersuchen, deren Wachstumsregulation der *in vivo*-Kontrolle am meisten entspricht. Dafür eignen sich embryonale Fibroblasten aus BALB/c-Mäusen, die nur wenige Generationen (ca. 6-7) in Kultur gehalten werden.

Die mit diesem Zellsystem gewonnenen Erkenntnisse ergeben folgendes Bild über die Synthese zellulärer und ins Kulturmedium abgegebener Glykokonjugate während des Zellzyklus: aus dem Einbau von ¹⁴C-Galaktose in Trichloroessigsäure-fällbares Zellmaterial kann man entnehmen, daß Glykoproteine bevorzugt während der S-Phase synthetisiert werden. Dies stimmt mit Daten überein, die mit Zell-Linien gewonnen wurden (63,64). Ferner deuten Vergleiche der Glykoproteinemuster auf Zellzyklus-abhängige Unterschiede in einzelnen Proteinen hin (124,125).

Glykolipide konnten nur als Bestandteil der Zelle und nicht im Kulturmedium nachgewiesen werden. Der Einbau von ¹⁴C-Galaktose in Neutralglykolipide und Ganglioside zeigt zwei Maxima: ein ersteres während der frühen S-Phase und

ein weiteres während der G_2 -Phase (siehe ausführliche Diskussion S. 58). Die Muster der radioaktiv markierten Neutralglykolipide wie Ganglioside zeigten jedoch während des Zellzyklus nur geringe Unterschiede, was auf eine gleichzeitige Synthese aller Glykolipide hinweist. Abweichend hiervon wurden nach Angaben von Wolf und Robbins (37) bei verschiedenen Zell-Linien einige Glykolipide bevorzugt zu bestimmten Zeiten synthetisiert. Übereinstimmend mit eigenen Ergebnissen sind die Befunde anderer Autoren, daß wachsende Zellen einen relativ geringen Anteil an komplexen Neutralglykolipiden zeigen (121,122).

Glykosaminoglykane sind nicht nur Bestandteil der Zelle, insbesondere der Plasmamembran, sondern werden auch in das Kulturmedium abgegeben (93,94,104,110). Da Glykolipide im Kulturmedium nicht nachgewiesen werden konnten, spricht das gegen die Vorstellung, daß Glykosaminoglykane mit Membranfragmenten abgegeben werden. Die maximale Abgabe der Hyaluronsäure ins Kulturmedium erfolgt vor der S-Phase. Dagegen wird zelluläre Hyaluronsäure bevorzugt etwas später in der S-Phase synthetisiert. Sowohl die zellulären wie ins Kulturmedium abgegebenen sulfatierten Glykosaminoglykanklassen zeigen kaum Unterschiede in der Markierung mit ^{14}C -Galaktose während des Zellzyklus. Demgegenüber zeigt die Sulfatierung der zellulären, als Chondroitinsulfat bezeichneten Klassen während dieser Zeit deutliche Schwankungen, insbesondere einen Anstieg zum Ende der Kultivierungsperiode, womit die Abnahme der Hyaluronsäure-Synthese untergeht. Gleichzeitig bleibt die Sulfatierung der Glykosaminoglykane im Kulturmedium konstant. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Synthese und Abgabe nicht-sulfatierter Glykosaminoglykanen bieten Chiarugi und Nannucchi, indem sie der Hyaluronsäure und sulfatierten Glykosaminoglykanen (Heparansulfat) eine antagonistische Rolle in der Wachstumskontrolle zu-

schreiben (123). Wie mit eigenen Ergebnissen in Einklang steht, ist ein hoher Anteil an Hyaluronsäure typisch für wachsende Zellen und wird daher als positives Element für Wachstum wie auch Bewegung gesehen (106,109). Die Frage, welche Funktionen die verschiedenen Glykosaminoglykane im Zellzyklus und der Wachstumsregulation ausüben, sei es als extrazelluläre oder intrazelluläre Komponenten, bedarf weiterer Untersuchungen.

LITERATUR

1. Pardee, A.B. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 1286-1290.
2. Smith, J.A., Martin, L. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 1263-1267.
3. Shields, R., Smith, J.A. (1977) J. Cell. Physiol. 91, 345-356.
4. Macieira-Coelho, A. (1967) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 548-552.
5. Shodell, M. (1975) Nature 256, 578-580.
6. Engelhardt, D.L., Jen-Hao, M. (1977) J. Cell. Physiol. 90, 307-320.
7. Heby, O., Andersson, G., Gray, J.W. (1978) Exp. Cell. Res. III, 461-464.
8. Stocker, M.G.P., Rubin, H. (1967) Nature 215, 171-172.
9. Oren, R., Kohn, A. (1969) J. Cell. Physiol. 74, 307-314.
10. Canagaratna, M.C.P., Riley, P.A. (1975) J. Cell. Physiol. 85, 271-282.
11. Trash, C., Cunningham, D. (1975) J. Cell. Physiol. 86, 301-310.
12. Skehan, P. (1976) Exp. Cell. Res. 97, 184-192.
13. Holley, R.W., Kiernan, J.A. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 2942-2945.
14. Warburton, M.J., Poole, B. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 2427-2431.
15. Holley, R.W. (1974) in: B. Clarkson, R. Baserga (Hrsg.) Control of Proliferation in Animal Cells S. 13-18 Cold Spring Harbor Laboratory.

16. Holley, R.W. (1975) *Nature* 258, 487-490.
17. Brooks, R.F. (1976) *Nature* 260, 248-250.
18. Ellem, K.A.O., Gierthy, J.F. (1977) *J. Cell. Physiol.* 92, 381-400.
19. Temin, H.M., Pierson, R.W.Jr., Dulak, N.C. (1972) in: G.H. Rothblat, V.J. Cristofalo (Hersg.) *Growth, Nutrition, and Metabolism of Cells in Culture Bd. I*, S. 51-81, Academic Press, New York.
20. Chan, A.C., Walker, I.G. (1977) *J. Cell. Biol.* 74, 365-370.
21. Macieira-Coelho, A. (1977) *Mechanisms of Ageing and Developement* 6, 341-343.
22. Razin, S., Pfendt, E.A., Matsumura, T., Hayflick, L. (1977) *Mechanisms of Ageing and Development*, 379-384.
23. Yamamoto, K., Yamamoto, M., Ooka, H. (1977) *Exp. Cell. Res.* 108, 87-93.
24. Todaro, G.K., Green, H. (1963) *J. Cell. Biol.* 17, 299-313.
25. Altman, P.L., Katz, D.D. Eds. in: *Biological Handbooks I*, Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda (1976) S. 38.
26. Hershko, A., Mamont, P., Shields, R., Tomkins, G.M. (1971) *Nature New Biology* 232, 206-211.
27. Rudland, P.S., Seifert, W., Gospodarowicz, D. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 2600-2604.
28. Sefton, B.N., Rubin, H. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 3154-3157.
29. Pardee, A.B., Jimenez de Asua, L.J., Rozengurt, E. (1974) in: *Control of proliferation in Animal Cells*, B. Clarkson, Baserga, R. (Hersg.) Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, S. 547-561.

30. Rozengurt, E. (1976) J. Cell. Physiol. 89, 627-632.
31. Pasternak, C.A., Sumner, M.C.B., Collin, R.C.L.S. (1974) in: Padilla, G.M., Cameron, I.L., Zimmermann, A.M. (Hrsg.) Cell Cycle Controls, Academic Press New York, S. 117-124.
32. Pasternak, C.A. (1976) J. theor. Biol. 58, 365-382.
33. Sumner, M.C.B., Collin, R.C.L.S., Pasternak, C.A. (1973) Tissue Antigens 3, 477-484.
34. Graham, J.M., Sumner, M.C.B., Curtis, D.H., Pasternak, C.A. (1973) Nature 246, 291-295.
35. Buell, D.N., Fahey, J.L. (1969) Science 164, 1524-1525.
36. Cikes, M., Friberg, S.Jr., (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 566-569.
37. Wolf, B.A., Robbins, P.W. (1974) J. Cell. Biol. 61, 676-687.
38. Fox, T.O., Sheppard, J.R., Burger, M.M. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 244-247.
39. Noonan, K.D., Levine, A., Burger, M.M. (1973) J. Cell. Biol. 58, 491-497.
40. Kraemer, P.M., Tobey, R.A. (1972) J. Cell. Biol. 55, 713-717.
41. Kraemer, P.M. (1972) in: Rothblat, G.H., Cristofalo, V.J. (Hrsg.) Growth, Nutrition, and Metabolism of Cells in Culture Bd. I, S. 371-426, Academic Press New York.
42. Singer, S.J., Nicolson, G.L. (1972) Science 175, 720-731.
43. Jarealachvili, J.N. (1977) Biochim. Biophys. Acta 469, 221-225.
44. Bretscher, M.S. (1973) Science 181, 622-629.
45. Sharon, F.J., Grant, C.W.M. (1977) J. Supra. Struc. 6, 249-258.

46. Brown, J.C., Hunt, R.C. (1976) in: Alan R. Liss Inc. (Hersg.), Membranes and Neoplasia: New Approaches and Strategies, S. 179-188, New York.
47. Rothman, J.E., Lenard, J. (1977) Science 195, 743-753.
48. Walsh, F.S., Crumpton, M.J. (1977) Nature 269, 307-311.
49. Evans, R.M., Fink, L.M. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5341-5344.
50. Blobel, G. (1977) in: B.R.Brinkley, Keith R.Porter (Hersg.), International Cell Biology 1976-1977, S.318-325.
51. Ratz, F.N., Rothman, J.E., Lingappa, V.R., Blobel, G., Lodish, H. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 74, 3278-3282.
52. Rothman, J.E., Lodish, H.F. (1977) Nature 269, 775-780.
53. Fransson, L.A., Rodien, L. (1967) J. Biol. Chem. 242, 4170-4175.
54. Guss, J.M.; Hukins, D.W.L., Smith, P.J.C., Winters, W.T., Struther, A. Moorhous, R., Rees, D.A. (1975) J. Mol. Biol. 95, 359-384.
55. Laurent, T.C., Björk, I., Pietruszkiewicz, A., Persson, H. (1963) Biochim. Biophys. Acta 78, 351-359.
56. Culp, L.A. (1974) J. Cell. Biol. 63, 71-83.
57. Yamada, K.M., Yamada, S.S., Pastan, J. (1976) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1217-1221.
58. Glaser, L. (1976) Trends in Biol. Sci. 1, 84-86.
59. Hakomori, S.J. (1975) Biochim. Biophys. Acta. 417, 55-89.
60. Nicolson, G.L. (1976) Biochim. Biophys. Acta. 458, 1-72.
61. Hynes, R.O. (1976) Biochim. Biophys. Acta 458, 73-107.
62. Yamada, K.M., Pastan, J. (1976) Trends in Biolog. Sci. 1, 222-224.

63. Bosmann, H.B., Winston, R.A. (1970) J. Cell. Biol. 45, 23-33.
64. Chatterjee, S., Sweeley, C.C., Velicer, L.F. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 585-592.
65. Farrant, J., Knight, S.C., McGann, L.E., O'Brien, J. (1974) Nature 249, 452-453.
66. Folch, J., Lees, M., Soane-Stanley, G.H. (1957) J. Biol. Chem. 226, 497-509.
67. Barland, P., Schroeder, E.A. (1970) J. Cell. Biol. 45, 662-668.
68. Carlsen, S.A., Till, J.E. (1975) Can. J. Biochem. 53, 106-108.
69. Brunette, D.M., Till, J.E. (1971) J. Membr. Biol. 5, 215-224.
70. Karush, F., Klinman, N.R., Marko, R. (1964) Anal. Biochem. 9, 100-114.
71. Lehnhardt, W.F., Münzler, R.J. (1968) J. Chromatogr. 34, 471-479.
72. Irevelyan, E.W., Procter, D.P., Harrison, J.S. (1950) Nature 166, 444-445.
73. Ludowieg, J., Vennesland, B., Dorfman, A. (1961) J. Biol. Chem. 236, 333-339.
74. Fransson, L.A., Rodien, L. (1967) J. Biol. Chem. 242, 4161-4169.
75. Rische, Z., Shettles, L.D. (1951) J. Biol. Chem. 192, 279.
76. Dietrich, C., McDuffie, N.M., Sampais, L.O. (1977) J. Chromatogr. 130, 299-304.
77. Breen, H., Weinstein, H.G., Andersen, M., Veis, A. (1970) Analyt. Biochem. 35, 146-159.
78. Laine, R.A., Hakomori, S. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1039-1045.

79. Yu, R.K., Ledeen, R.W. (1972) J. Lipid Res. 13, 630-686.
80. Saito, T., Hakomori, S. (1971) J. Lipid Res. 12, 257-259.
81. Maxwell, M.A.B., Williams, J.P. (1967) J. Chromatogr. 31, 62-68.
82. Carter, T.P., Kanfer, J. (1973) Lipids 8, 537-548.
83. Vaheri, A., Ruoslahti, E., Sarvas, M., Nurminen, M. (1973) J. Exp. Med. 138, 1356-1364.
84. Holley, R.W., Kierman, J.A. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71, 2908-2911.
85. Buck, C.A., Warren, L. (1976) J. Cell. Physiol. 89, 187-200.
86. Brooks, R.F. (1975) J. Cell. Physiol. 86, 369-378.
87. Gaunt, S.J., Subak-Sharpe, J.H. (1977) Exp. Cell. Res. 109, 341-348.
88. Onodera, K., Sheinin, R. (1970) J. Cell. Sci. 7, 337-355.
89. Kraemer, P.M. (1971) Biochemistry 10, 1437-1445.
90. Rosenfelder, G., van Eijk, R.V.W., Monner, D.A., Mühlradt, P.F. (1978) Eur. J. Biochem. 83, 571-580.
91. Hammerman, P., Todaro, G.J., Green, H. (1965) Biochim. Biophys. Acta 101, 343-351.
92. Masher, D.F., Wing, D.A. (1976) J. Exp. Med. 143, 462-467.
93. Sear, C.H.J., Grant, M.E., Jackson, D.S. (1977) Biochem. J. 168, 91-103.
94. Sjöberg, J., Fransson, L.-A. (1977) Biochem. J. 167, 383-392.
95. Bostock, C.J., Prescott, D.M., Kirkpatrick, J.B. (1971) Exp. Cell. Res. 68, 163-168.
96. Ley, K.D. (1975) J. Cell. Biol. 66, 95-101.
97. Lemback, K.J. (1976) J. Cell. Physiol. 89, 277-288.
98. Moscatelli, D., Pubin, H. (1977) J. Cell. Physiol. 91, 79-88.

99. Pratt, H.P.M., Fitzgerald, P.A., Saxon, A. (1977) Cell. Immunol. 32, 160-170.
100. Moscatelli, D., Rubin, H. (1975) Nature 254, 65-66.
101. Mostafapour, M.-K., Green, H. (1975) J. Cell. Physiol. 86, 313-320.
102. Hassell, J.A., Engelhardt, D.L. (1976) Biochemistry 15, 1375-1381.
103. Lingwood, C.A., Thomas, D.B. (1975) J. Cell. Physiol. 86, 635-640.
104. Davidson, E.A., MacPherson, J. (1975) Exptl. Cell. Res. 9, 218-222.
105. Levey, G.A., Marsh, C.A. (1960) in: P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck (Hersg.) The Enzymes Vol. 4, Part A, Academic Press, New York und London.
106. Eijk, R.V.W., Mühlradt, P.F., (1977) Eur. J. Biochem. 78, 41-54.
107. Vogel, K.G., Kelley, R.O. (1977) J. Cell. Physiol. 92, 469-480.
108. Quissell, D.O., Changus, J.E., Yonan, T., Pitot, H.C. (1977) Analyt. Biochem. 79, 240-256.
109. Cohn, R.H., Cassiman, J.-J., Bernfield, M.R. (1976) J. Cell. Biol. 71, 280-294.
110. Conrad, G.W., Hamilton, C., Haynes, E. (1977) J. Biol. Chem. 252, 6861-6870.
111. Vannucchi, S., Chiarugi, V.P. (1977) J. Cell. Physiol. 90, 503-510.
112. Hopwood, J.J., Dorfman, A. (1977) J. Biol. chem. 252, 4777-4785.
113. Yogeewaran, G., Wherett, J.R., Chatterjee, S., Murray, R.K. (1970) J. Biol. Chem. 245, 6718-6725.

114. Yogeewaran, G., Sheinin, R., Wherett, J.R., Murray, R.K. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5146-5158.
115. Keenan, T.W., Morri, D.J., Huang, C.M. (1972) FEBS letters 24, 204-208.
116. Chatterjee, S., Sweeley, C.C., Velicer, L.F. (1975) J. Biol. Chem. 250, 61-66.
117. Hakomori, S. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 67, 1741-1747.
118. Langenbach, R., Kennedy, S. (1978) Exp. Cell. Res. 112, 361-372.
119. Gahmberg, C.G., Hakomori, S. (1974) Biochem. Biophys. Res. commun. 59, 283-291.
120. Hirschberg, C.B., Wolf, B.A., Robbins, P.W. (1975) J. Cell. Physiol. 85, 31-40.
121. Critchly, D.R., Macpherson, J. (1973) Biochim. Biophys. Acta. 296, 145-159.
122. Hakomori, S., Gahmberg, C.G., Laine, R., Kijimoto, S. (Hersg.) Growth Behavior, Contact and Surface Structure of Cells, Cold Spring Harbor Laboratory.
123. Chiarugi, V.P., Vannucchi, S. (1976) J. theor. Biol. 61, 459-475.
124. Hunt, R.C., Gold, E., Brown, J.C. (1975) Biochim. Biophys. Acta 413, 453-458.
125. Johnsen, S., Stokke, T., Prydz, H. (1975) Exp. Cell. Res. 93, 245-251.

ZUSAMMENFASSUNG

Glykolipide, Glykoproteine und Glykosaminoglykane gehören zu den charakteristischen Bestandteilen der kultivierten Zelle. Sie sind vor allem in der Plasmamembran angereichert und werden z.T. auch in das Kulturmedium abgegeben. Um die Zellzyklus-abhängige Synthese und Abgabe ins Kulturmedium dieser Glykokonjugate zu untersuchen, wurde der Einbau verschiedener radioaktiver Vorstufen in Kulturen von embryonalen Mäusefibroblasten verfolgt. Diese Zellen zeigen ein "normales" Verhalten, indem sie nach Erreichen einer bestimmten Zelldichte ihr Wachstum einstellen und in der G_1 -Phase verharren. Erneute Aussaat solcher Zellen führt zu synchronisiertem Wachstum.

Es wurden folgende Fragen gestellt:

- 1.) Wann während des Zellzyklus wird ^{14}C -Galaktose, ^3H -Leucin und $^{35}\text{SO}_4^{--}$ in Glykokonjugate der Zelle inkorporiert und ins Kulturmedium abgegeben?
- 2.) In welchen Verhältnissen liegen die radioaktiv markierten Glykokonjugate auf der Zelle insgesamt, auf der Plasmamembran im besonderen und im Kulturüberstand vor?
- 3.) Werden zu irgendwelchen Zeiten bestimmte Glykolipide und Glykosaminoglykane bevorzugt synthetisiert?

Als Versuchssystem dienten ruhende embryonale Mäusefibroblasten, die mit Trypsin suspendiert und neu ausgesät wurden. Die Einbaukinetik von ^3H -Thymidin sollte die Zeit maximaler DNS-Synthese (S-Phase) nach der Aussaat anzeigen.

1.) Die Ergebnisse des Einbaus von ^{14}C -Galaktose und ^3H -Leucin in zelluläre Glykokonjugate und in das Kulturmedium abgegebene Glykokonjugate konnte in zwei Gruppen eingeteilt werden: in eine Gruppe mit hohen und in eine Gruppe mit niedrigen Einbauraten.

In beiden Gruppen war der Einbau von ^{14}C -Galaktose in Trichloressigsäure-fällbares Zellmaterial maximal während der S-Phase. ^3H -Leucin wurde ebenfalls bevorzugt während der S-Phase inkorporiert. Die radioaktive Markierung der zellulären Glykosaminoglykane durch ^{14}C -Galaktose erfolgte vorwiegend zur gleichen Zeit, wobei die $^{35}\text{SO}_4^{--}$ -Markierung bis auf einen Anstieg am Ende der Kultivationsperiode parallel verlief.

Die Abgabe des gesamten mit ^{14}C -Galaktose markierten Materials in das Kulturmedium fand ebenfalls maximal vor oder in der S-Phase statt, dabei zeigte der Einbau von ^3H -Leucin kaum Unterschiede. Da dieses Material zum großen Teil aus Glykosaminoglykanen besteht, wurde der Einbau der ^{14}C -Galaktose in isolierte Glykosaminoglykane im Kulturüberstand getrennt untersucht. Es zeigte sich, daß ^{14}C -markierte Glykosaminoglykane ebenfalls kurz vor der S-Phase abgegeben wurde. Dagegen blieb die Markierungsrate mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ fast konstant.

Glykolipide, aus den Zellen mit Chloroform-Methanol extrahiert, konnten bevorzugt einmal während der S-Phase und zum anderen während der G_2 -M-Phase mit ^{14}C -Galaktose markiert werden.

2.) Durch den Einsatz degradierender Enzyme und anschließende Gelfiltration konnte der Anteil der Glykolipide, Glykoproteine und Glykosaminoglykane in ganzen Zellen, in einer isolierten Plasmamembranfraktion und im Kulturmedium verglichen werden. Es zeigte sich, daß die Zelle alle drei

Glykokonjugate enthielt, wobei die Plasmamembran in Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen angereichert war. Im Kulturüberstand konnten keine radioaktiv markierte Glykolipide nachgewiesen werden.

3.) Es konnte gezeigt werden, daß unabhängig von der Einbaurate von ^{14}C -Galaktose in die gesamten Glykolipide, zu allen Zeiten alle Neutralglykolipide und Ganglioside radioaktiv markiert wurden. Mittels Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie konnten keine quantitative Unterschiede in einzelnen Glykolipiden während des Zellzyklus gefunden werden.

Drei in der Agarose-Gelelektrophorese getrennte Glykosaminoglykanfraktionen konnten mit ^{14}C -Galaktose markiert werden. (In Hydrolyse-Versuchen wurde gezeigt, daß dabei ^{14}C -Galaktose in Glukuronsäure umgewandelt worden war.) Zwei Fraktionen konnten zusätzlich mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markiert werden, sie unterschieden sich dabei in ihrem Sulfatierungsgrad. Außerdem zeigte sich, daß die ^{14}C -Markierung vor allem der zellulären Glykosaminoglykane nicht mit der $^{35}\text{SO}_4^{--}$ -Markierung korrelierte. Die Zelle und der Kulturüberstand enthielten diese radioaktiv markierten Glykosaminoglykanen zu unterschiedlichen Anteilen. Diese Ergebnisse werden in Beziehung zur Wachstumskontrolle gesetzt.

Curriculum Vitae

Angela Otto	geboren am 15.5.1950 in Freiburg im Breisgau
1956-1958	Besuch der Volksschule in Herford, Westfalen
Mai 1958	Auswanderung nach Los Angeles, U.S.A.
1958-1963	Besuch der "elementary school"
1963-1966	Besuch der "high School", mit Abschlußzertifikat
September 1966	Rückkehr in die Bundesrepublik
1966-1968	Besuch des Goethe-Gymnasiums (mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig) in Dortmund bis zum Abitur
Herbst 1968	Studienbeginn in Biologie an der Universität Freiburg
Oktober 1970	Vordiplom in Biologie
1970-1972	Weiterstudium in Biochemie, Genetik, Zellbiologie, Immunologie Tätigkeit als Biologietutor
WS 1972/73	Diplomprüfungen in physikalischer Chemie, Biochemie, Genetik, Zellbiologie
1973-1974	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Immunbiologie unter der Leitung von Dr. E. Rüde mit Versuchen zur genetischen Kontrolle der Sekundärantwort von synthetischen Polypeptiden in Milzzellkulturen Hilfsassistent bei Praktika (allgemeine Biologie, Biochemie)
Winter 1975	Beginn der Doktorarbeit unter der Leitung von Dr. P.F. Mühlradt in der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig.
Frühjahr 1978	Abschluß der Promotionsarbeit

